

UNIVERSITE DE GENEVE
Département de biologie animale

FACULTE DES SCIENCES
Professeur Gérard de HALLER

INVESTIGATION DES PROTEINES STRUCTURELLES
DANS LA ZONE CORTICALE DE TETRAHYMENA PYRIFORMIS
(PROTOZOAIRE CILIE) :
RECHERCHE DE TECHNIQUES NOUVELLES
POUR L'ETUDE MORPHO-GENETIQUE

THESE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences, mention biologique

par

Pierre VAUDAUX

de

Genève

Thèse N° 1670

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1974

UNIVERSITE DE GENEVE
Département de biologie animale

FACULTE DES SCIENCES
Professeur Gérard de HALLER

**INVESTIGATION DES PROTEINES STRUCTURELLES
DANS LA ZONE CORTICALE DE TETRAHYMENA PYRIFORMIS
(PROTOZOAIRE CILIE) :
RECHERCHE DE TECHNIQUES NOUVELLES
POUR L'ETUDE MORPHO-GENETIQUE**

THESE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences, mention biologique

par

Pierre VAUDAUX

de

Genève

Thèse N° 1670

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1974

La Faculté des sciences, sur le préavis du professeur ordinaire G. de Haller, directeur de thèse et d'une commission composée du professeur ordinaire J.-P. Bargetzi (Faculté des sciences), autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 11 juillet 1974

Le doyen :
Jean Muller

Thèse No 1670



Je remercie très sincèrement les docteurs Richard Allen, Jean Grain, Jytte Nilsson et Norman Williams qui m'ont permis de reproduire leurs excellentes figures.

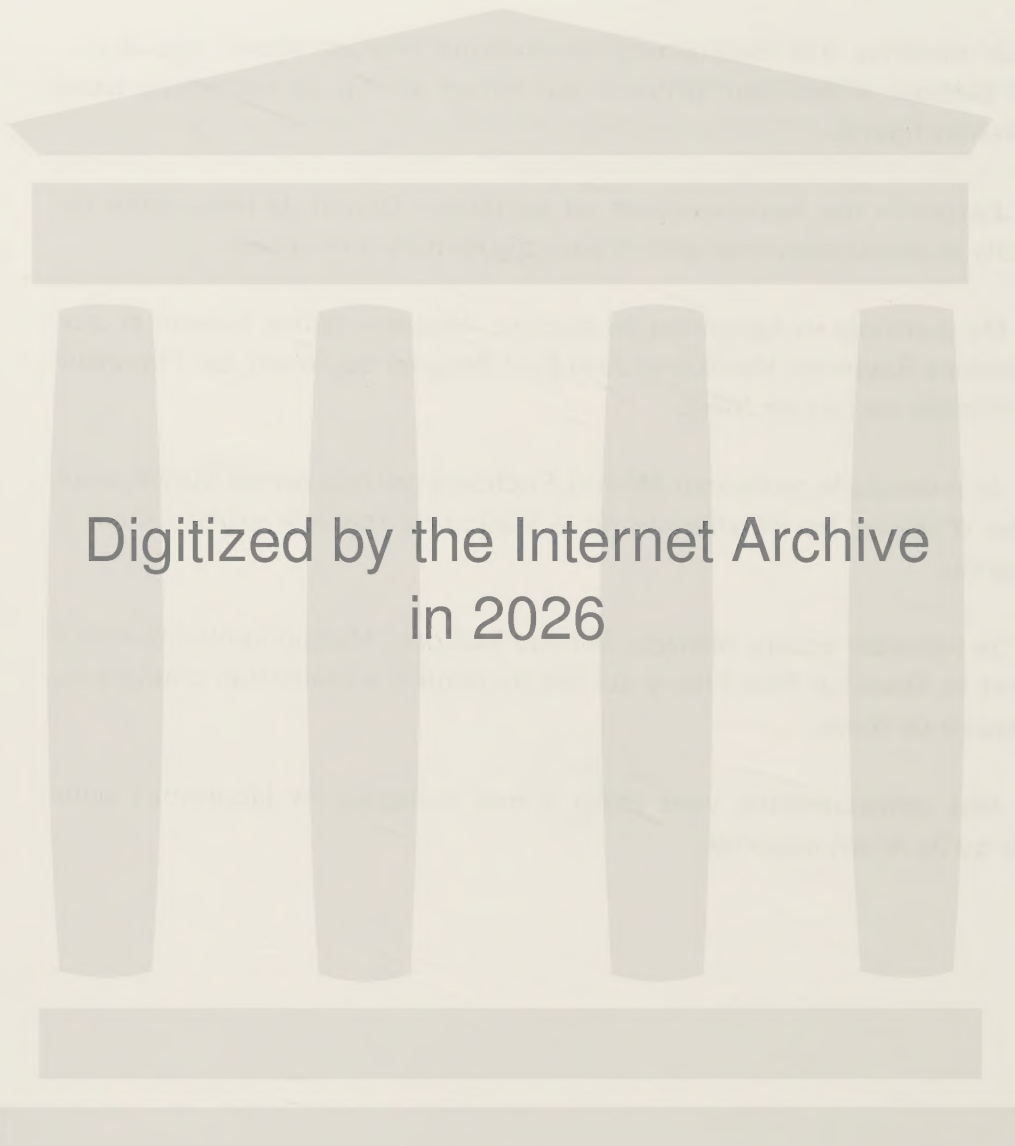
J'exprime ma reconnaissance au professeur Gérard de Haller pour les conseils et encouragements qu'il m'a prodigués durant ce travail.

Ma gratitude va également au docteur, Madame Janine Beisson et aux professeurs Raymond Hovasse et Jean-Paul Bargetzi qui m'ont fait l'honneur de participer au jury de thèse.

Je remercie le professeur Michail Fischberg qui m'a permis durant deux années d'utiliser les installations de la Station de zoologie expérimentale à Malagnou.

Je remercie encore Madame Mireille Tschopp, Mademoiselle Christiane Ducret et Monsieur Paul Fleury qui ont participé à la réalisation pratique du manuscrit de thèse.

Mes remerciements vont enfin à mes collègues de laboratoire pour l'aide qu'ils m'ont apportée.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545931_0053

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION

I.1. INTERET MORPHOGENETIQUE DU SYSTEME ETUDIE

I.1.1. Organisme étudié	p. 1
I.1.2. Division cellulaire	p. 1
I.1.3. Topographie du cortex	p. 3
I.1.4. Ultrastructure du cortex	p. 3
I.1.5. Evolution du cortex pendant le cycle cellulaire	p. 11
I.1.6. Contrôle de l'évolution corticale	p. 12

I.2. IDENTIFICATION DE PROTEINES CORTICALES : IMPLICATIONS MORPHOGENETIQUES

p. 12

I.3. METHODES D'ISOLEMENT DES PROTEINES CORTICALES

p. 13

I.3.1. Essais de purification d'organelles individuelles	p. 13
I.3.2. Purification de complexes d'organelles (bouches ou pellicules isolées) et analyse protéique	p. 14

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. CONDITIONS DE CULTURE

II.1.1. Généralités	p. 15
II.1.2. Cultures massives	p. 15
II.1.2.1. Méthode 1	p. 15
II.1.2.2. Méthode 2	p. 16

II.2. RECOLTE DES CELLULES

II.2.1. Méthode 1	p. 16
II.2.2. Méthode 2	p. 16

II.3. SEPARATION DES STRUCTURES CORTICALES ET CYTOPLASMIQUES

II.3.1. Purification partielle de cinétosomes et cinétodesmes	p. 17
II.3.1.1. Méthode 1	p. 17
II.3.1.2. Méthode 2	p. 18
II.3.2. Purification d'appareil buccaux	p. 19
II.3.3. Purification de pellicules	p. 21
II.3.4. Purification de cils	p. 22
II.3.5. Purification partielle de noyaux	p. 23
II.3.6. Fractionnement d'autres organelles cytoplasmiques	p. 24

II.4. SEPARATION DES PROTEINES

II.4.1. Système discontinu SDS	p. 25
II.4.2. Mesures de la migration relative et du poids moléculaire des protéines	p. 26

II.5. TESTS DE SOLUBILISATION SELECTIVE

II.6. MICROSCOPIE ORDINAIRE

II.7. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

II.7.1. Méthode d'adhésion	p. 28
II.7.2. Coupes ultrafines de structures biologiques fixées	p. 28

III.	<u>PURIFICATION DE STRUCTURES CORTICALES</u>	p. 30
III.1.	<u>ISOLEMENT DE STRUCTURES CORTICALES (INDIVIDUELLES OU EN GROUPES)</u>	p. 30
III.2.	<u>SEPARATION ET PURIFICATION DE STRUCTURES CORTICALES (INDIVIDUELLES OU EN GROUPES)</u>	p. 32
III.3.	<u>DISCUSSION</u>	p. 32
IV.	<u>ETUDE DE QUELQUES PROTEINES MAJEURES DANS LES BOUCHES ET PELLICULES PURIFIEES</u>	p. 34
IV.1.	<u>ULTRASTRUCTURES DES BOUCHES ET DES PELLICULES PURIFIEES</u>	p. 34
IV.2.	<u>PROTEINES CORTICALES MAJEURES</u>	p. 41
IV.3.	<u>DETERMINATION DU POIDS MOLECULAIRE DES PROTEINES MAJEURES DU CORTEX</u>	p. 49
IV.4.	<u>ESSAIS DE LOCALISATION DES PROTEINES MAJEURES DES BANDES A A F DANS DES STRUCTURES DEFINIES DU CORTEX</u>	p. 55
IV.5.	<u>DISCUSSION</u>	p. 65
V.	<u>DISCUSSION GENERALE</u>	p. 71
VI.	<u>REFERENCES</u>	p. 75
VII.	<u>ANNEXES</u> 1	p. 80
	2	p. 82

CHAPITRE IINTRODUCTIONI.1. INTERET MORPHOGENETIQUE DU SYSTEME ETUDIEI.1.1. Organisme étudié

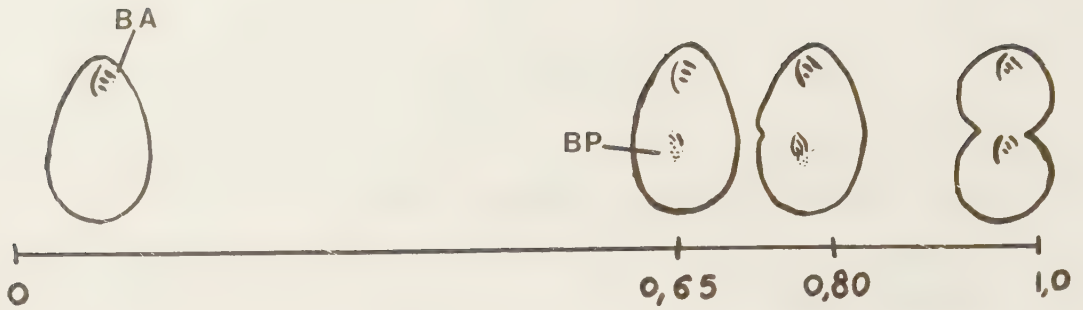
Tetrahymena pyriformis est une cellule d'environ 50 microns de longueur, 20 microns de largeur, appartenant au groupe des Ciliés Holotriches. C'est un organisme prédateur, dépourvu de photosynthèse et capable de se déplacer rapidement à l'aide de cils locomoteurs. Il absorbe sa nourriture à l'aide d'un appareil buccal très différencié, pourvu de cils vibratiles.

Son cytoplasme renferme les principaux organites communs à toute cellule animale : microsomes, mitochondries, etc. Il possède un grand noyau très polyploïde, appelé macronoyau, un petit noyau diploïde, appelé micronoyau. Ce dernier est absent dans la souche que j'ai étudiée.

Tetrahymena est facilement maintenu en laboratoire dans des conditions axéniques. Il se nourrit généralement d'un bouillon de protéines solubles dégradées. Dans les conditions les plus favorables (température optimale, nourriture abondante) Tetrahymena prolifère rapidement jusqu'à une concentration de $10^5 - 10^6$ cellules/ml. La vitesse de prolifération la plus rapide correspond à un doublement de la population toutes les 3 heures.

I.1.2. Division cellulaire

Examinons ce qui se passe au niveau de chaque cellule pendant la prolifération de la population (fig. 1).



0,65 et 0,80 sont des fractions d'un cycle cellulaire dont la durée est égale à 1.

Fig. 1. Chaque cellule synthétise et reproduit une copie d'elle-même en 3 h (temps de génération).

BA : bouche antérieure. BP : bouche postérieure.

Le schéma de la fig. 1 fait abstraction des phénomènes intracellulaires, qui ressemblent, à quelques variantes près, à ceux de l'ensemble des cellules animales. Je ne les traiterai pas ici. Les phénomènes les plus originaux de la division cellulaire chez les Ciliés se passent à la périphérie cellulaire. Cette zone est appelée cortex. Un élément essentiel du cortex est l'appareil buccal (abr. bouche) dessiné schématiquement à la fig. 1. Pendant la progression du cycle cellulaire, la bouche antérieure, qui sera attribuée à la cellule-fille antérieure, ne subit que des modifications mineures, non représentées sur la fig. 1. Par contre, la bouche postérieure, qui sera attribuée à la cellule-fille postérieure, ne se forme que progressivement pendant la 2ème moitié du cycle cellulaire. La formation de cette bouche postérieure se fait non seulement d'une façon rigoureusement séquentielle, mais encore à un emplacement très précis de la cellule. L'ensemble de ces phénomènes est appelé la stomatogénèse et se trouve décrit en détail dans deux revues récentes (1,2).

I.1.3. Topographie du cortex

L'ensemble du cortex de *Tetrahymena* constitue un territoire bien défini topographiquement. L'avant de la cellule correspond à l'extrémité la plus proche de la bouche : c'est le pôle antérieur. L'arrière de la cellule, moins pointu que l'avant, constitue le pôle postérieur. Lorsqu'on observe en microscopie ordinaire une enveloppe corticale isolée et privée de ses cils, on voit que le cortex est essentiellement constitué d'un ensemble de points, répartis régulièrement sur toute la surface (fig. 2). La seule perturbation à ce réseau de points est la région buccale. Le réseau d'environ 500 points est ordonné en 16 (nombre le plus fréquent) rangées longitudinales allant d'un pôle à l'autre. On les appelle méridiens ou cinéties. Deux méridiens supplémentaires vont du pôle postérieur à la bouche. Grâce à la présence de la bouche, on peut déterminer sans ambiguïté la droite et la gauche de la cellule. De même, on peut attribuer à chaque cinétie un numéro, compris entre 1 et 18, à partir d'un méridien déterminé par la position de la bouche.

Ces quelques notions topographiques illustrent la possibilité, pour un investigateur, de localiser avec précision n'importe quel point de la surface cellulaire. Les études les plus élaborées dans ce domaine de la cytogéométrie se trouvent dans les travaux de Nanney (ex. 3).

I.1.4. Ultrastructure du cortex

L'étude de l'évolution du cortex pendant le cycle cellulaire nécessite une connaissance préalable de son ultrastructure. Revenons au groupe de 500 points décrits plus haut. Chacun de ces points représente la base d'un cil, appelé cinétosome ou grain basal. Cette organelle a une structure très proche de celle du centriole placé au pôle d'un fuseau mitotique. Chez *Tetrahymena*, le cinétosome a l'aspect d'un cylindre de $0,2\ \mu$ de diamètre et de $0,7\ \mu$ de longueur.



Fig. 2. Topographie du cortex. Vue en microscopie ordinaire (contraste de phase) d'une enveloppe corticale isolée.

B : bouche x 2.000

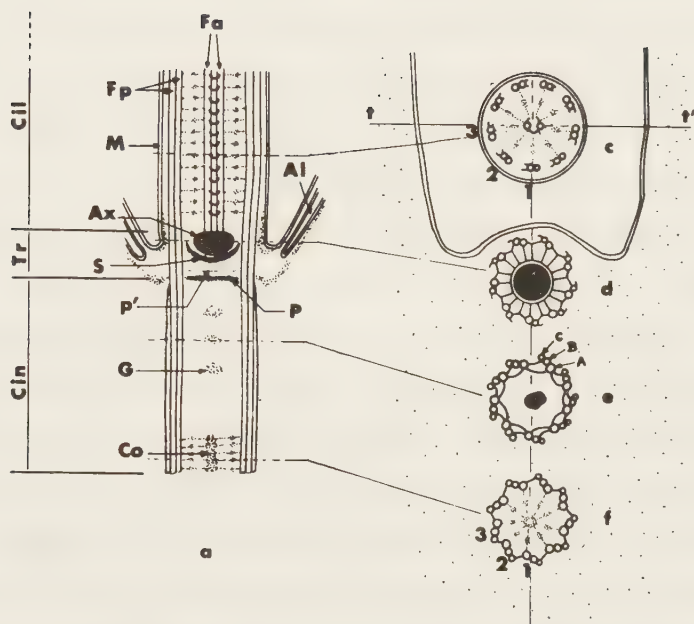


Fig. 3. Coupes longitudinale et transversale d'un complexe cinétosome-cil. Dessin de Grain (4), reproduit avec la permission de l'auteur.

- Fa : doublet central
- Fp : doublets externes
- M : membrane ciliaire
- Al : alvéole (voir fig. 4)
- Ax : axosome
- S : septum situé au-dessus de la plaque terminale
- p', p : septa de la plaque terminale
- Co : partie centrale du cartwheel
- G : structures internes du cinétosome
- Tr : zone de transition

Le dessin de la fig. 6 montre l'emplacement et l'orientation de ce cylindre dans le cortex. Le cinétosome est composé principalement d'une couronne de 27 microtubules de 20 nm de diamètre disposés à la périphérie du cylindre. Ces microtubules sont groupés en 9 triplets de 3 tubules chacun (fig. 3). Pour comprendre la liaison du cinétosome avec le cil, il est nécessaire de rappeler la structure fondamentale de l'axonème ciliaire (fig. 3). Ce dernier est constitué de 20 microtubules parallèles au grand axe du cil. Ces microtubules forment aussi une couronne périphérique composée de 9 groupes de 2 tubules : les doublets externes. La dixième paire de microtubules est placée au centre du cylindre. Les doublets externes de l'axonème sont en continuité parfaite avec deux microtubules de chaque triplet cinétosomien. Le troisième microtubule de chaque triplet s'arrête au point de rencontre du cinétosome avec le cil. A ce niveau, une double plaque de 35nm d'épaisseur sépare les cavités du cinétosome et du cil, ne laissant passer que les neuf paires de microtubules citées plus haut (fig. 3). Cette plaque s'appelle la plaque terminale (5). Les microtubules centraux de l'axonème ciliaire terminent leur course contre l'axosome (fig. 3). D'autres éléments que les microtubules sont placés dans la cavité du cinétosome. Le cartwheel (fig. 3) a, comme son nom l'indique, la forme d'une roue de char. Il est situé dans la partie la plus profonde du cinétosome, appelée par convention partie proximale (la partie proche du cil étant la partie distale). D'autres structures placées à l'intérieur du cinétosome sont moins bien connues. Je les appellerai structures internes.

La fig. 4 montre comment le cinétosome est relié à la paroi cellulaire. Cette dernière comporte plusieurs couches. La plus interne, l'épithème (fig. 4) est en continuité directe avec la plaque terminale du cinétosome. Ce n'est pas une membrane au sens strict du terme, mais une couche assez homogène de 15 - 30 nm d'épaisseur (6). Au-dessus se trouvent trois couches de membranes lipoprotéiques. Deux d'entre elles (P2 et P3) fusionnent autour du cil pour former un espace clos : le sac alvéolaire. La troisième (P1) est la membrane limitante externe. Elle est en continuité directe avec la membrane ciliaire (fig. 4).

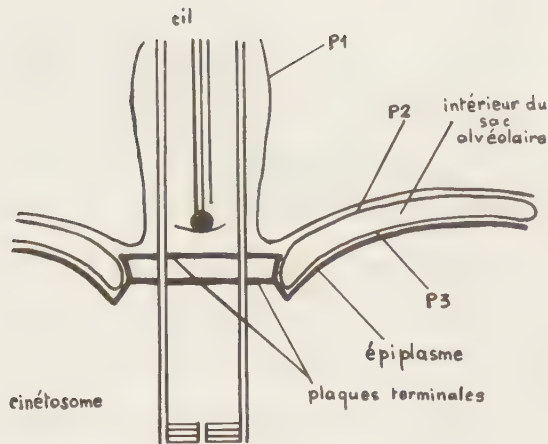


Fig. 4. Connexion du complexe cinétosome-cil avec les membranes (P1 à P3) et l'épiplasme.

Un autre groupe structural comprend les fibres infraciliaires rattachées à la base du cinétosome (fig. 5).

- a) Le cinétodesme, fibre à structure périodique, part en avant et à droite du cinétosome.
- b) Le faisceau microtubulaire transverse part à l'avant gauche du cinétosome et prend une trajectoire courbe, transversale au grand axe cellulaire (fig. 5).
- c) Le faisceau microtubulaire postérieur part du cinétosome dans une direction postérieure oblique par rapport au grand axe cellulaire. Il a aussi une trajectoire courbe (fig. 6). Ces trois fibres infraciliaires sont parfois appelées dérivés du cinétosome, car elles prennent naissance à son contact. A cet endroit, un manchon dense (fig. 5) entoure le cinétosome.

L'ensemble cinétosome + fibres infraciliaires + épiplasme + membranes forment une unité ciliaire. Le cortex somatique (toute la surface sauf la région buccale) comprend environ 500 unités ciliaires juxtaposées selon le diagramme de la fig. 6. Deux groupes supplémentaires de microtubules sont représentés sur ce dessin :



Fig. 5. Cinétosome + fibres infraciliaires. D'après un dessin d'Allen (6), reproduit avec la permission de l'auteur.

kf : cinétodesme

tt : faisceau microtubulaire transverse

La flèche montre le départ du faisceau microtubulaire postérieur.

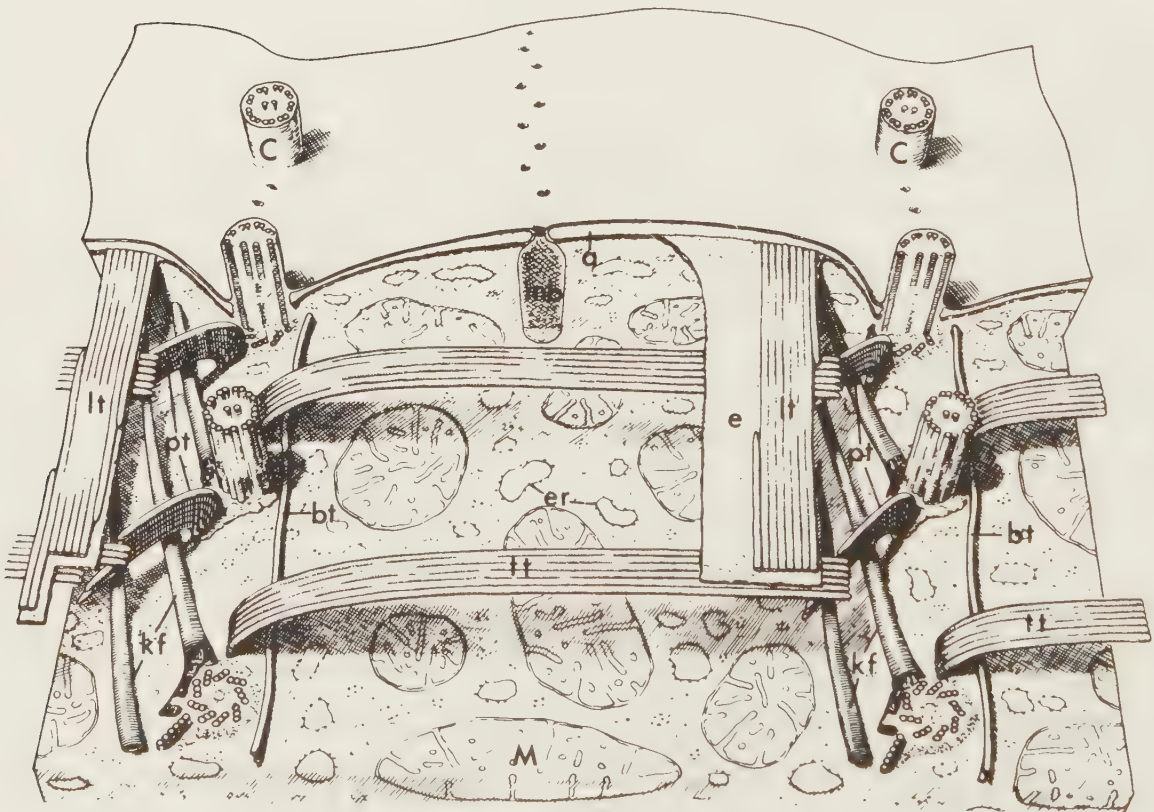


Fig. 6. Reconstitution tridimensionnelle du cortex somatique de *Tetrahymena pyriformis* par Allen (6).

a : sac alvéolaire	C : cil	pt : faisceau microtubulaire postérieur
lt : faisceau microtubulaire longitudinal	e : épiplasma	bt : microtubule basal
mb : mucocyste	M : mitochondrie	er : réticulum endoplasmique

- a) Les faisceaux microtubulaires longitudinaux sont placés entre les cinéties.
- b) Les microtubules basaux ont une course un peu sinueuse. Ils relient les bases cinétosomiennes des cinéties.

Les mucocystes représentés sur la fig. 6 sont des organelles originaires de l'endoplasme. A l'état de maturation, ils déchargent dans le milieu ambiant leur contenu muqueux, à travers des pores spécialement formés dans le cortex.

La bouche représente une modification de l'ultrastructure du cortex somatique (fig. 7). Les unités corticales subsistent, mais ont fusionné en quatre groupes : une membrane ondulante (abr. UM, undulating membrane) et trois membranelles. D'un côté de la bouche (à droite) se trouve l'UM composée d'une double rangée d'unités corticales très rapprochées. De l'autre côté se trouvent les trois membranelles (fig. 7), composées chacune de trois rangées d'unités corticales très rapprochées. Dans l'UM et les membranelles, les unités corticales sont modifiées de la façon suivante :

- a) Les membranes alvéolaires et l'épithélium sont absents. Par contre, la membrane limitante externe (Pl) est présente.
- b) Les cinétodesmes et les faisceaux transverses sont absents.
- c) Les fibres postciliaires persistent, mais leur course est très différente de leurs homologues dans le cortex somatique.
- d) Les parties proximales et distales des cinétosomes sont entourées de réseaux de microfilaments très abondants.

- e) La rangée interne de cinétosomes de l'UM ne porte pas de cil.

Les membranelles et l'UM sont reliées entre elles par des réseaux microfilamenteux et des faisceaux microtubulaires (= fibres postciliaires modifiées). Ces connexions sont variées et complexes :

- a) Les connexions membranelles relient les membranelles entre elles.
- b) Les connexions croisées relient les membranelles à l'UM.
- c) Les connexions périphériques relient les extrémités des membranelles à celles de l'UM.

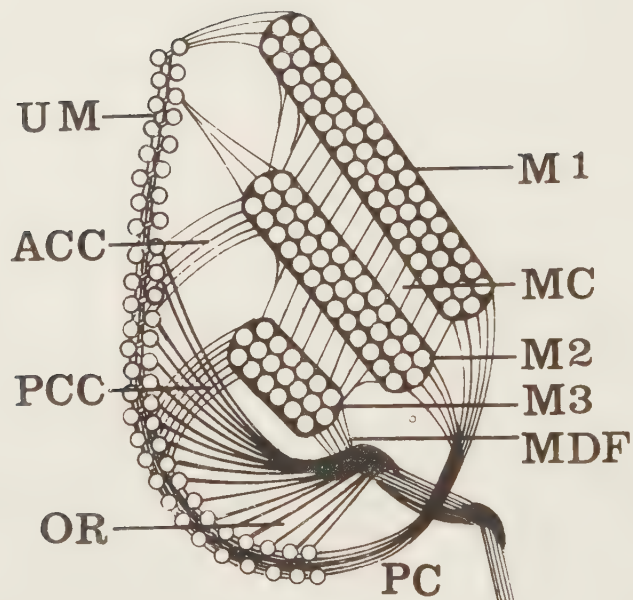


Fig. 7. Projection bidimensionnelle d'une bouche de *Tetrahymena pyriformis*. Dessin de Nilsson et Williams (26), reproduit avec la permission des auteurs.

M1, M2, M3 : membranelles

UM : membrane ondulante

MC : connexions membranelles

ACC, PCC : connexions croisées

PC : connexions périphériques

Les membranelles et l'UM sont aussi reliées par les couches de membranes P1 à P3 et l'épiplasme. Une grande partie de la bouche est ainsi tapissée de sacs alvéolaires similaires à ceux de la zone somatique. Dans la partie droite de la bouche, les alvéoles sont comprimées entre une série de crêtes appelées ribs. L'intérieur de ces crêtes est parcourue par des microtubules issus de l'UM (postciliaires modifiés). Ces tubules et les crêtes, associés à des réseaux de microfilaments, descendent jusqu'au fond de la bouche dans la région du cytopharynx. Cette région, qui sépare l'intérieur de la cellule du milieu ambiant, est le site contrôlant l'ingestion. La zone du cytopharynx est détruite pendant les étapes du fractionnement cellulaire. Elle sort donc du cadre de la présente recherche.

I.1.5. Evolution du cortex pendant le cycle cellulaire

Tetrahymena doit doubler le nombre de ses unités ciliaires pendant le cycle cellulaire. Les nouvelles unités ciliaires apparaissent à l'intérieur des cinéties, à proximité d'anciennes unités ciliaires. Ce processus se déroule d'une façon continue pendant le cycle cellulaire et à n'importe quel endroit du cortex (1,2). Le cinétosome est le premier élément d'une nouvelle unité corticale. Il se développe à proximité d'un cinétosome que l'on peut qualifier d'ancien. Ce processus est décrit par Allen (7). Le cinétosome en formation a un emplacement très précis par rapport à la position de l'ancien cinétosome et de ses dérivés. Il se forme à angle droit de l'ancien cinétosome. Puis il achève son développement en se redressant et en migrant jusqu'à la limite antérieure de son unité corticale, où il formera une nouvelle unité, insérée entre deux anciennes. Les dérivés du nouveau cinétosome se développent à partir de sa base. Le cil se construit dans une direction centrifuge à partir du sommet du nouveau cinétosome.

I.1.6. Contrôle de l'évolution corticale

Les mécanismes de contrôle de cette évolution pendant le cycle cellulaire sont encore mal connus. Ils coordonnent aussi bien les phénomènes agissant au niveau de l'unité corticale que ceux qui ont lieu au niveau de l'ensemble de ces unités (ex. contrôle du nombre total d'unités corticales). De nombreux investigateurs ont tenté de localiser les centres de contrôle morphogénétique dans le cortex ou dans le noyau. Les résultats les plus récents obtenus sur plusieurs espèces de Ciliés (*Tetrahymena*, *Paramécie*, *Stentor*, *Euplotes*) indiquent que des altération nucléaires (mutation génétique) ou corticales (bouversement de la topographie par des greffes ou d'autres manipulations) modifient un ou plusieurs centres de contrôle morphogénétique. Ceux-ci semblent donc localisés aussi bien dans le noyau que dans le cortex. Cette localisation multiple des centres de contrôle rend encore plus difficile l'élucidation de leurs mécanismes. Ces derniers peuvent donc difficilement être compris sans une analyse préalable des composantes moléculaires du cortex (voir revues : 1,3,8-10,25,27).

I.2. IDENTIFICATION DE PROTEINES CORTICALES : IMPLICATIONS MORPHOGENETIQUES

La grande majorité des structures biologiques étudiées dans le monde vivant se sont révélées être composées, essentiellement ou en partie, de protéines. Ces dernières, grâce à leur extrême diversité, sont sans doute à l'origine de la grande variété des structures biologiques. L'étude des protéines contenues dans les structures corticales semble donc un élément-clé pour comprendre l'évolution des structures corticales. On peut également s'attendre à ce que certaines protéines corticales aient non seulement un rôle structural, mais aussi une fonction enzymatique ou régulatrice. Les protéines structurelles sont souvent présentes à un grand nombre d'exemplaires (ex. la tubuline, unique constituant des microtubules). D'autres structures, p. ex. les membranes lipo-

protéiques, renferment un grand nombre de protéines différentes et souvent peu abondantes. On ne sait pas si c'est le cas chez *Tetrahymena*, dont les protéines membranaires n'ont jamais été séparées et analysées.

Les investigations de cette thèse ont abouti à la mise en évidence de plusieurs protéines corticales majeures. Une partie d'entre elles ont pu être localisées dans des structures corticales définies. Les protéines mineures ont été laissées de côté pour des raisons techniques. Leur mise en évidence demanderait à la fois des fractions corticales plus abondantes et plus pures.

I.3. METHODES D'ISOLEMENT DES PROTEINES CORTICALES

L'isolement et l'identification de protéines corticales furent abordées de deux manières :

- a) par la purification d'organelles individuelles : les cinétosomes et les cinétodesmes.
- b) par la purification de complexes d'organelles : les bouches et les pellicules.

I.3.1. Essais de purification d'organelles individuelles

Plusieurs auteurs (11 - 15) ont tenté de purifier les cinétosomes. Après la purification (16) des pellicules*, puis leur fragmentation par différents procédés mécaniques ou chimiques par centrifugation différentielle, ils ont tenté de les fragmenter en organelles individuelles par plusieurs méthodes. Les fractions de cinétosomes obtenues furent insuffisamment pures pour permettre une analyse protéique. Seuls Rubin et Cunningham (15) tentèrent une identification de protéines situées dans le cinétosome et le cinétodesme.

* Le terme de pellicule est souvent employé pour désigner l'ensemble du cortex, isolé du reste de la cellule. La pellicule ne comprend pas les cils qui se sont détachés. Pour les morphologistes, le terme de pellicule désigne seulement l'ensemble des membranes et l'épiplasme.

Une partie des essais de purification d'organelles que j'ai pratiqués ont aussi impliqué la purification préalable de pellicules isolées. Le reste des essais impliquèrent la fragmentation immédiate des pellicules au moment de la lyse cellulaire. Dans tous les cas, les structures individuelles furent insuffisamment purifiées pour être analysables chimiquement.

I.3.2. Purification de complexes d'organelles (bouches ou pellicules isolées) et analyse protéique

Plusieurs investigateurs ont mis au point des méthodes de purification des appareils buccaux : ils ont fait lyser les cellules par divers agents chimiques (17,18,19,20,21). Seuls Rannestad et Williams ont entrepris l'analyse des protéines buccales par électrophorèse (21). Ils ont identifié la composante microtubulaire de la bouche à celle de l'axonème ciliaire. De plus, ils ont mis en évidence trois protéines non microtubulaires, qu'ils n'ont pas pu localiser avec précision.

D'autres investigateurs ont développé des méthodes de purification pelliculaire : ils ont fait lyser les cellules mécaniquement dans un milieu salin (22), sucré (23) ou contenant un détergent (24).

Dans aucun cas, les protéines corticales ne furent analysées.

Dans ce travail, les bouches furent purifiées par une modification de la méthode de Wolfe (20), les pellicules par une méthode originale. Ces deux complexes d'organelles constituèrent un bon matériel pour l'investigation de quelques protéines corticales.

CHAPITRE IIMATERIEL ET TECHNIQUESII.1. CONDITIONS DE CULTUREII.1.1. Généralités

Les cellules Tetrahymena pyriformis, souche GL, proviennent d'un stock qui fut envoyé gracieusement par le laboratoire de Zoologie 2, Centre d'Orsay, Université de Paris.

Les cellules sont cultivées sur un milieu axénique liquide à base de 1 % Proteose Peptone (abr. PP) Difco. Elles sont maintenues en vie dans des cultures de stock grâce à des repiquages hebdomadaires dans 50 ml de milieu frais (contenus dans un erlenmeyer de 100 ml). Pendant quelque temps, elles poussèrent sur un milieu contenant 0,5 % NaCl en plus de la PP. Ensuite, le NaCl fut remplacé par 0,5 % d'un extrait de levure (Yeast extract Difco).

II.1.2. Cultures massives

Pour la séparation d'organelles, des cultures plus massives furent réalisées. Une des deux techniques suivantes fut employée.

II.1.2.1. Un aliquot de 1 à 2 ml de culture de stock (contenant plus de 10^5 cellules/ml) est inoculé dans 1,2 l de milieu contenant 1 % PP + 0,5 % NaCl. Ce volume est contenu dans un erlenmeyer de 2 l. La croissance dure 4 jours à la température du laboratoire, sans agitation du milieu de culture. Les cellules se multiplient donc dans des conditions relativement anaérobies, jusqu'à une concentration d'environ 4×10^4 /ml. Dans quelques expériences, le NaCl du milieu de culture fut remplacé par 0,5 % Y, ce qui augmenta le rendement cellulaire jusqu'à 2×10^5 /ml.

II.1.2.2. Un aliquot de 50 ml de culture de stock, contenant plus de 10^7 cellules, juste entrées en phase stationnaire, est inoculé dans 1 l de milieu contenant 1 % PP, 0,5 % Y, 0,5 % NaCl. Ce volume forme une couche de quelques cm dans un erlenmeyer de 6 l. La croissance dure 24 h et le milieu est brassé par la rotation d'un agitateur magnétique. Les cellules poussent donc en aérobiose, jusqu'à une concentration d'environ 3×10^5 /ml.

II.2. RECOLTE DES CELLULES

Une des deux techniques suivantes fut employée.

II.2.1. Les cellules sont concentrées par centrifugation (abr. CF) dans des tubes de 50 ml placés sur le rotor angulaire SS-34 d'une centrifugeuse Sorvall SS-4. La durée de la CF est de 5 mn à 6000 g. Les cellules sont resuspendues dans 50 ml de milieu de lavage (0,2 M saccharose dans 10 mM de tampon phosphate de sodium, pH 6,8) et recentrifugées 5 mn à 6000 g.

II.2.2. Les cellules sont concentrées par CF dans un petit rotor à "flux continu" (construit dans ce laboratoire par E. Nagy) adapté sur une petite centrifugeuse "clinique". Ce rotor tourne à moins de 1000 g et la récolte dure environ 15 mn. Les cellules sont lavées de leur milieu de culture par le passage en flux continu de 500 ml d'une solution contenant 0,12 M de saccharose dans H_2O .

II.3. SEPARATION DE DIVERSES STRUCTURES CORTICALES ET CYTOPLASMIQUES

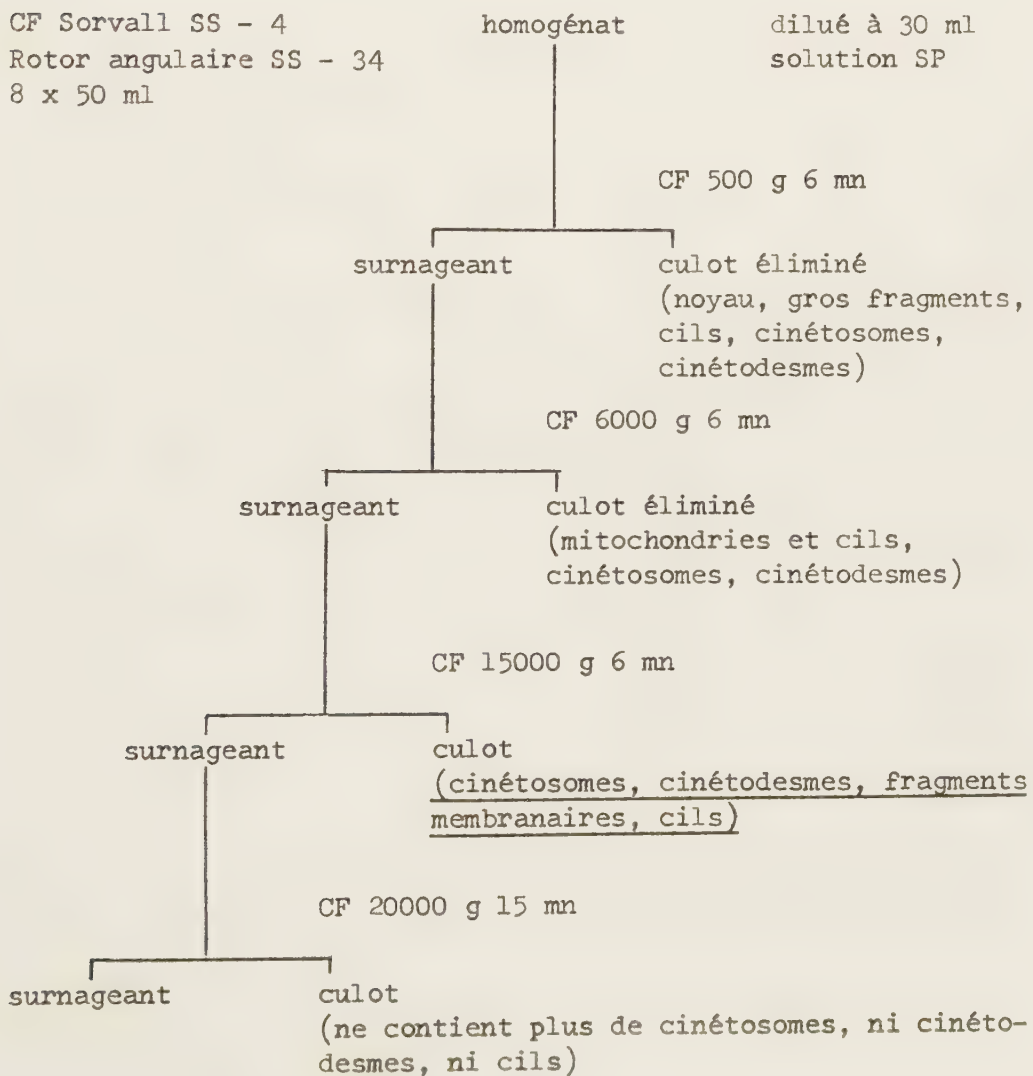
Toutes les expériences se déroulent à $2^{\circ}C$, soit en chambre froide, soit dans une centrifugeuse réfrigérée.

II.3.1. Purifications partielles de cinétosomes et cinétodesmes

Deux techniques furent employées.

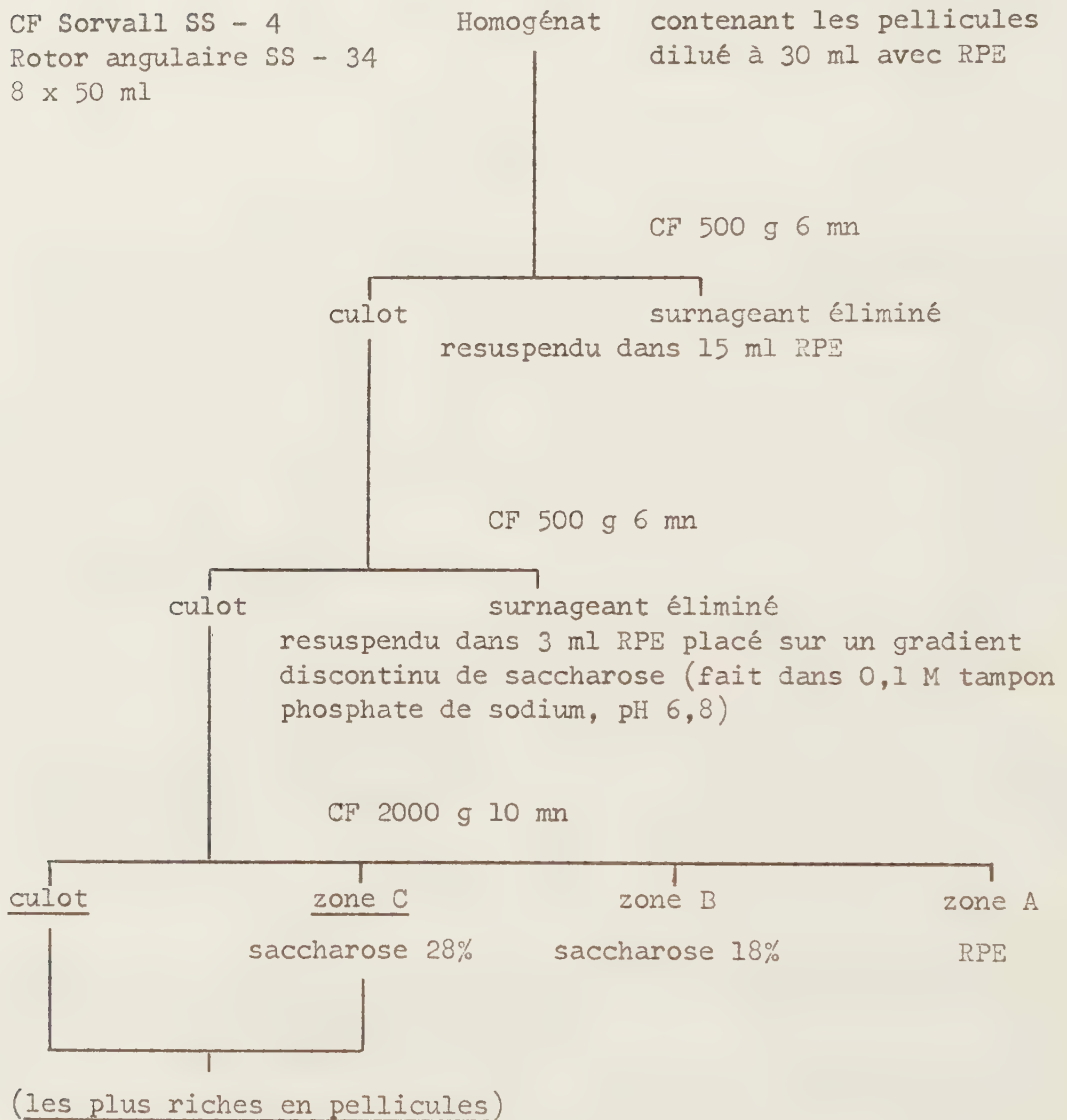
II.3.1.1. Les cellules cultivées selon II.1.2.1., récoltées selon II.2.1., sont concentrées dans 5 à 10 ml de milieu SP (0,25 M de saccharose dans 10 mM de tampon phosphate de sodium pH 6,8), puis broyées dans un Potter (Arthur Thomas company) pendant 1 mn. Les pellicules se décomposent en petits fragments, représentant des organelles individuelles ou de petits complexes d'organelles. La suite des opérations figure dans le diagramme de la fig. 8.

Fig. 8



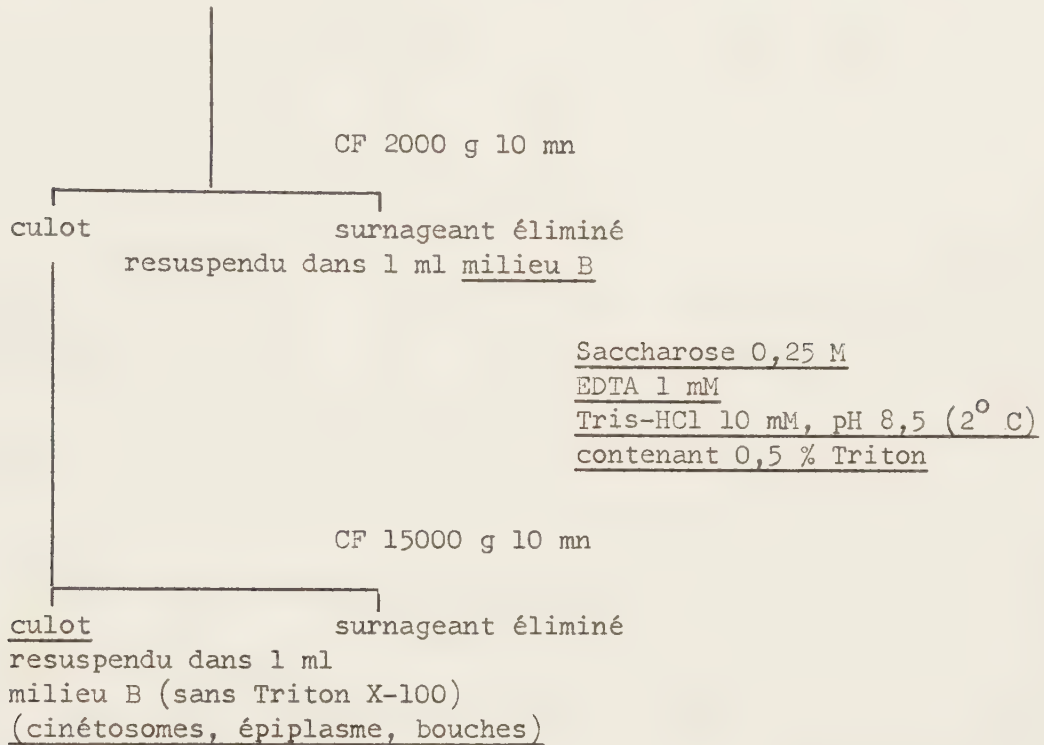
II.3.1.2. (Voir aussi annexe 2). Les cellules, cultivées selon II.1.2.1., récoltées selon II.2.1., sont resuspendues dans 5 à 10 ml de milieu RPE (0,2 M raffinose, 1 mM EDTA, 10 mM tampon phosphate de sodium, pH 6,8), puis broyées dans un Potter pendant 5 mn. Ce milieu laisse intactes les pellicules isolées. La suite des opérations figure dans le diagramme de la fig. 9.

Fig. 9



II.3.1.2. (Suite)

Fraction riche en pellicules

II.3.2. Purification d'appareils buccaux (abr. bouches)

Les cellules, cultivées selon II.1.2.2., récoltées selon II.2.2., sont concentrées dans 50 ml de saccharose 0,25 M. Les bouches sont isolées et purifiées selon la méthode de Wolfe (20). La purification est améliorée à l'aide d'une centrifugation supplémentaire, décrite dans le diagramme de la fig. 10.

Fig. 10

CF MSE HS - 25
Rotor angulaire
8 x 50 ml

1 Vol. Cellules dans 0,25 M saccharose.

Milieu brassé par la rotation
d'un agitateur magnétique

+ 5 Vol. Milieu SEMT

1 M saccharose

1 mM EDTA

0,1 % 2-mercaptoethanol

10 mM Tris pH 9,3 (2° C)

+ 0,5 Vol. Triton X-100 (solution 10 %)

dans H₂O

CF 12000 g 30 mn

culot

surageant éliminé

resuspendu dans 20 ml SEMT

étape effectuée
3 fois de suite

CF 12000 g 15 mn

culot

surageant éliminé

dernier culot

(enrichi en bouches)

resuspendu dans 3 ml H₂O déposé sur
une solution contenant 30 % saccha-
rose (dans H₂O)

étape ajoutée à la
méthode de Wolfe.

CF 2800 g 10 mn

Rotor horizontal
6 x 15 ml

culot

zone C

zone B

zone A

saccharose 30%

Interface SEMT-

H₂O

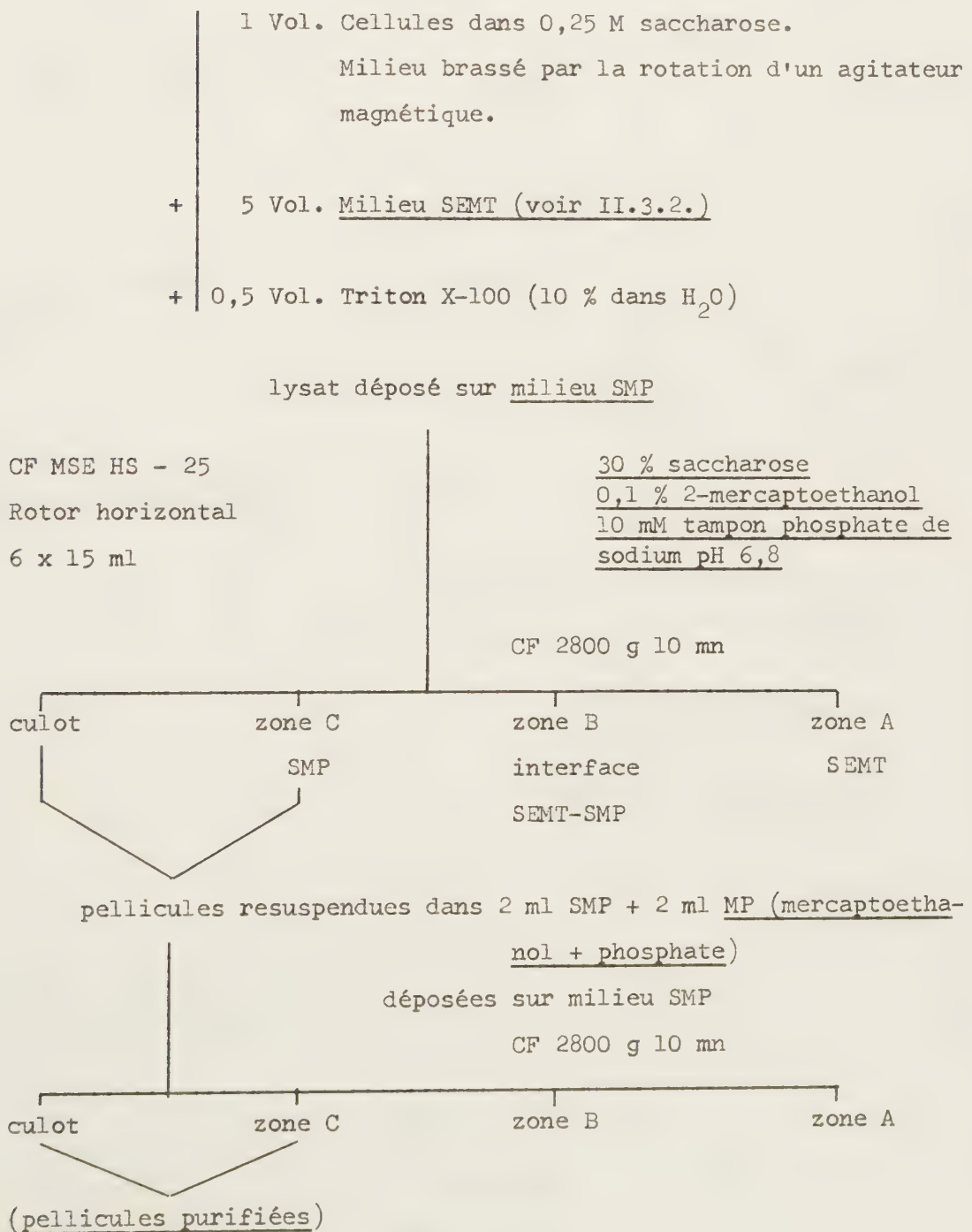
saccharose 30%

(bouches purifiées)

II.3.3. Purification de pellicules

Une nouvelle méthode fut mise au point après celle décrite sous II.3.1.2. Les cellules, cultivées selon II.1.2.2., récoltées selon II.2.2., sont concentrées dans 50 ml de saccharose 0,25 M. La suite des opérations figure dans le diagramme de la fig. 11.

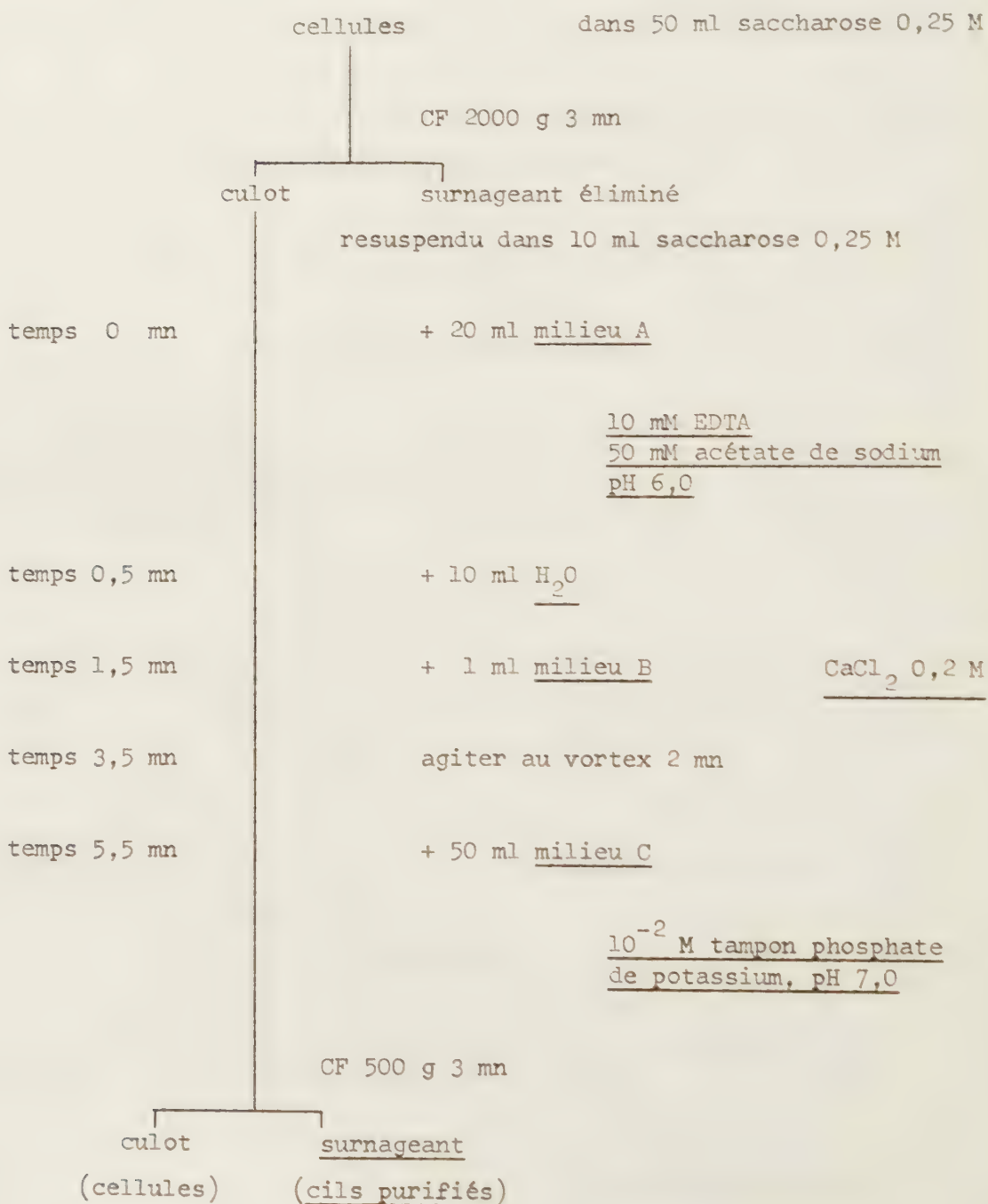
Fig. 11



II.3.4. Purification des cils

Les cils sont détachés des cellules vivantes selon la méthode de Rosenbaum et Carlson (28). Les cellules, cultivées selon II.1.2.2., récoltées selon II.2.2., sont concentrées dans 50 ml de saccharose 0,25 M. La suite des opérations est illustrée dans le diagramme de la fig. 12.

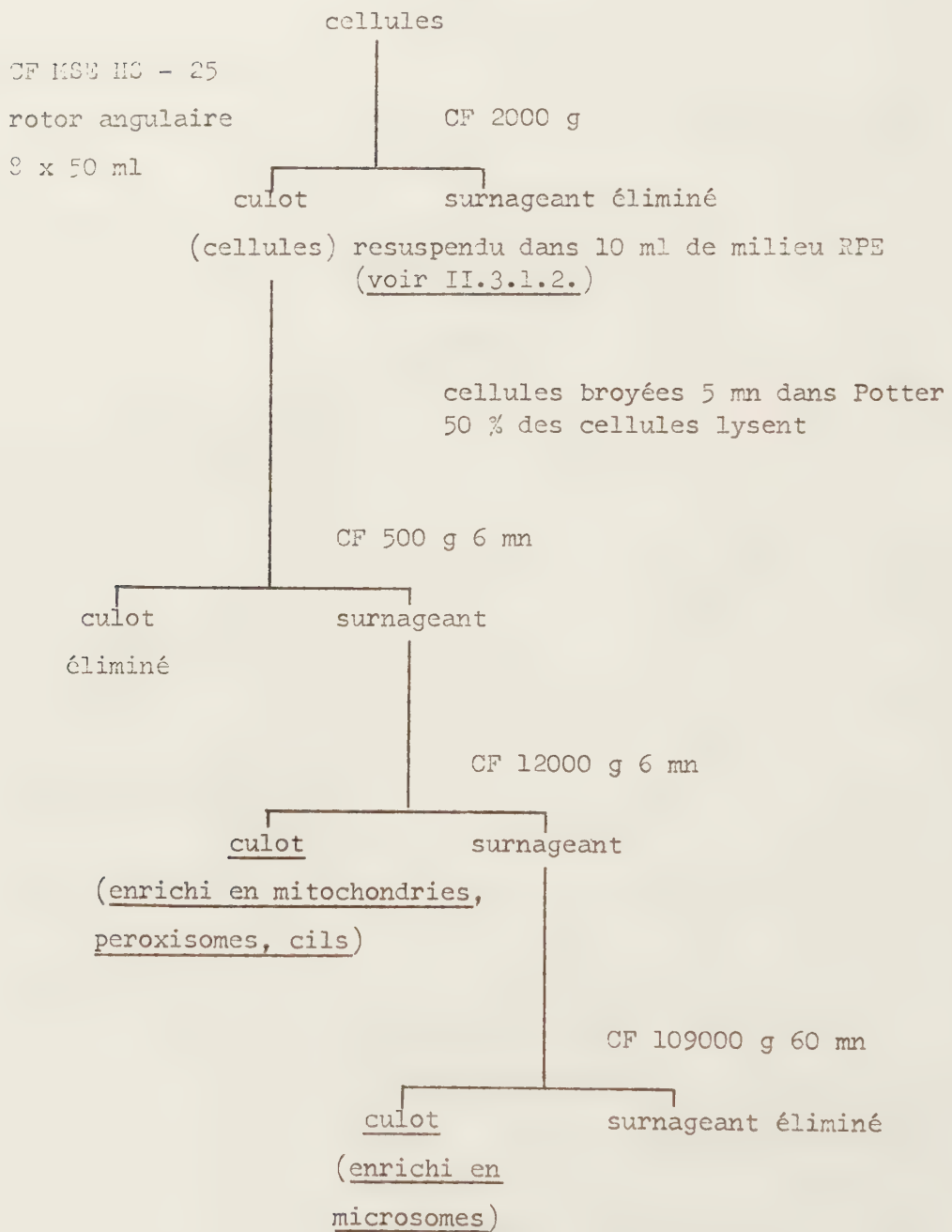
Fig. 12



II.3.6. Fractionnement d'autres organelles cytoplasmiques

Les cellules cultivées selon II.1.2.2., récoltées selon II.2.2., sont concentrées dans 50 ml de saccharose 0,25 M. La suite des opérations est illustrée dans le diagramme de la fig. 14.

Fig. 14



II.4. SEPARATION DES PROTEINES

Les séparations furent faites à une échelle analytique. Dans tous les cas, l'électrophorèse fut pratiquée sur gel d'acrylamide (système à 12 tubes de Büchler).

II.4.1. Système discontinu SDS (sodium dodecylsulfate)

Le système de Laemmli fut adopté (30). La composition des gels et des réservoirs figure dans la table I.

Table I

Réservoir	0,1 % SDS 0,192 M Glycine 0,025 M Tris pH 8,3
Gel supérieur	0,1 % SDS 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8 (20° C) 3 % acrylamide (abr. <u>acryl.</u>) 0,08 % bisacrylamide (abr. <u>bis</u>) 0,04 % ammonium persulfate 0,07 % TEMED (tétraméthyléthylène- diamine)
Gel inférieur	0,1 % SDS 0,375 M Tris-HCl, pH 8,7 (20° C) 7,5 % acryl. 0,2 % bis 0,05 % ammonium persulfate 0,1 % TEMED

Dans le gel inférieur, des concentrations de 5 %, 10 %, 12,5 % et 15 % acryl. sont aussi employées. Dans tous les cas, le rapport acryl./bis reste le même.

Tampon d'échantillon	3	% SDS
	5	% 2-mercaptoéthanol
	0,0625	M Tris-HCl, pH 6,8 (20° C)

Dans certains cas, le mercaptoéthanol est volontairement omis du tampon d'échantillon. Les échantillons sont chauffés 1 mn à 100° C et refroidis avant l'addition de 2 gouttes de glycerol pur et 1 goutte de Bleu de bromophénol (0,025 %) par ml d'échantillon. Le volume de chaque échantillon placé sur le gel ne dépasse pas 0,2 ml. L'électrophorèse est appliquée avec un courant constant de 2 mA/tube, le voltage augmentant progressivement de 50 V à 100 V. Après l'électrophorèse, les gels SDS sont fixés et colorés pendant une nuit par une solution contenant 0,25 % de Coomassie brilliant Blue G-250 (Serva) dans du méthanol-H₂O-acide acétique (5:5:1). La décoloration a lieu durant 24 h dans du méthanol-H₂O-acide acétique (5:5:1), puis dans de l'acide acétique 7 % où les gels sont conservés.

II.4.2. Mesure de migration relative du poids moléculaire des protéines

Dans le système SDS, la migration relative des protéines est calculée par rapport à celles qui ont migré avec le front. Cette migration est généralement mesurée sur des tracés densitométriques. Ceux-ci sont effectués sur une table traçante Philips, qui enregistre les mesures densitométriques d'un appareil construit dans le laboratoire (par E. Nagy). La qualité de ces mesures est comparable à celle de bons appareils commerciaux. Les gels sont lus avec un filtre de 579 nm.

Le poids moléculaire (abr. PM) est estimé dans le système SDS selon le principe découvert par Shapiro et coll. (31). Les complexes protéines-SDS migrent de telle façon qu'il existe une relation simple entre leur mobilité relative et le logarithme de leur PM. Dans les cas les plus favorables, cette relation est linéaire. Le PM des polypeptides non caractérisés est déterminé grâce à une droite de référence tracée à l'aide de protéines de PM connu.

II.5. TESTS DE SOLUBILISATION SELECTIVE

Le principe du test consiste à solubiliser une partie des structures corticales en maintenant les autres intactes. Les protéines solubilisées sont analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (système SDS, II.4.1.). Elles sont mises autant que possible en corrélation avec les structures solubilisées.

Méthode : les bouches ou pellicules purifiées sont dialysées pendant 24 h à 2°C contre 200 volumes du milieu solubilisant choisi. Puis, elles sont centrifugées pendant 15 mn à 15000 g. Le surnageant contient les protéines solubles, le culot les protéines insolubles. Surnageant et culot resuspendu sont dialysés contre 200 Vol. H₂O, puis contre 200 Vol. de tampon d'échantillon (système SDS, II.4.1.). Les opérations d'électrophorèse et de coloration des gels se déroulent selon II.4.1. Les structures corticales centrifugées à 15000 g sont examinées au microscope électronique par la méthode d'adhésion (II.7.1.).

Milieus solubilisants : 1) La haute force ionique, d'après la formule de Gibbons (32) :

0,6 M KCl
1 mM EDTA
10 mM Tris-HCl pH 8,2 2°C

2) Acide acétique 0,1 N pH 2,9

3) L'acide phosphotungstique 1 % ou 0,1 %
(dans H₂O) neutralisé par NaOH pH 7,0.

Le test de solubilisation est modifié selon les indications de Rubin et Cunningham (15) : a) La solubilisation dure 15 mn au lieu de 24 h.

b) Les protéines corticales insolubles sont séparées des protéines solubles par une CF de 100000 g 1 h (au lieu de 15000 g 10 mn).

c) Les protéines solubles et insolubles sont dialysées contre 0,1 % SDS (dans H₂O) avant d'être dialysées contre le tampon d'échantillon du système SDS (II.4.1.).

II.6. MICROSCOPIE ORDINAIRE

Les étapes de purification corticale (II.3.) et les tests de solubilisation (II.5.) sont constamment contrôlés par des observations en microscopie ordinaire. Dans tous les cas, un objectif "contraste de phase", placé sur un microscope Wild M-20 est utilisé. Ce dispositif sert également pour les comptages cellulaires qui sont effectués dans une cellule d'hémacytométrie.

II.7. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Seule la microscopie par transmission est utilisée, avec un appareil Hitachi HS 7S.

II.7.1. Méthode d'adhésion

Une goutte de l'échantillon à observer est déposée sur une grille de cuivre de 400 mesh, recouverte d'un film de collodion carboné. Ce film a été rendu hydrophile par une décharge électrique (voir détails dans annexe 2). Après 30 sec, la grille est essorée, ne laissant sur le film que les structures biologiques adsorbées. Puis elle est colorée pendant 20 sec. la plupart du temps avec de l'acide phosphotungstique (abr. PTA) qui ne colore pas les structures négativement, mais positivement.

La méthode d'adhésion est décrite dans l'annexe n° 2 sous le terme de "negative staining".

II.7.2. Coupes ultrafines de structures biologiques fixées

Les structures biologiques sont fixées selon les indications de Rannestad et Williams (21), dans un mélange de glutaraldéhyde et de OsO_4 0,5 % (dans 0,1 M de tampon phosphate de sodium pH 7,0). Ces deux fixateurs sont mélangés au dernier moment, à la température de la chambre froide. Après la fixation, qui dure 20 mn, les structures fixées sont centrifugées 5 mn à 2000 g, puis resuspendues

dans 0,1 M de tampon phosphate de sodium, pH 7,0. Les cellules sont laissées dans ce tampon pendant 6 h à 2° C, puis elles sont centrifugées 10 mn à 3000 g pour former un culot compact. Ce dernier est partagé en fragments qui sont inclus dans un bloc d'agar fondant. Les blocs d'agar refroidis et le matériel fixé sont deshydratés, puis enrobés dans l'Epon. Les coupes ultrafines sont produites au moyen d'un microtome manuel Porter Blum. Elles sont colorées à l'acétate d'uranyle pendant 3 h, puis au citrate de plomb pendant 15 mn.

CHAPITRE III

PURIFICATION DE STRUCTURES CORTICALES

III.1. ISOLEMENT DE STRUCTURES CORTICALES (INDIVIDUELLES OU EN GROUPES)

L'isolement de groupes structurels corticaux (bouches et pellicules) est possible en employant des techniques appropriées de lyse cellulaire. Les bouches résistent bien à un broyage mécanique ou à une lyse au Triton X-100. Par contre, les pellicules se désagrègent rapidement dans ces conditions, sauf si on fait lyser les cellules dans un milieu spécial, contenant de l'EDTA ou de l'EGTA. Les effets de ces milieux sur les cellules entières et les pellicules sont décrits dans une section spéciale, placée en annexe (voir annexe n° 1). Dans les autres cas, elles se décomposent en petits fragments hétérogènes : les cinétosomes sont parfois individuels, parfois en groupes. Leur plaque terminale est toujours entourée de lambeaux de pellicule (fig. 15). Ces lambeaux contiennent de l'épiplasma et (ou) des membranes. Les cinétodesmes restent souvent attachés aux cinétosomes. Ceux qui sont détachés sont peu nombreux et leur forme est parfois altérée. Différents traitements mécaniques et chimiques furent entrepris afin de détacher efficacement les cinétosomes des pellicules et des cinétodesmes. Aucune méthode n'arriva à casser ou solubiliser sélectivement les zones de jonction cinétosome-épiplasma et cinétosome-cinétodesme (fig. 15).

Les cinétosomes et les cinétodesmes sont encore plus difficiles à détacher des pellicules isolées et purifiées par la méthode II.3.1.2., sous l'effet de traitements mécaniques ou chimiques. Les détails de ces expériences sont exposés dans l'article "Purification of cortical structures..." placé en annexe (annexe 2). Seul un traitement solubilisant (Triton X-100 à pH 8,5) parvient à fragmenter la pellicule isolée en cinétosomes individuels ou en petits groupes et à solubiliser les cinétodesmes. Mais, l'épiplasma reste attaché aux cinétosomes intacts. Lorsqu'il est détaché, le cinétosome est partiellement désintégré (voir annexe 2).

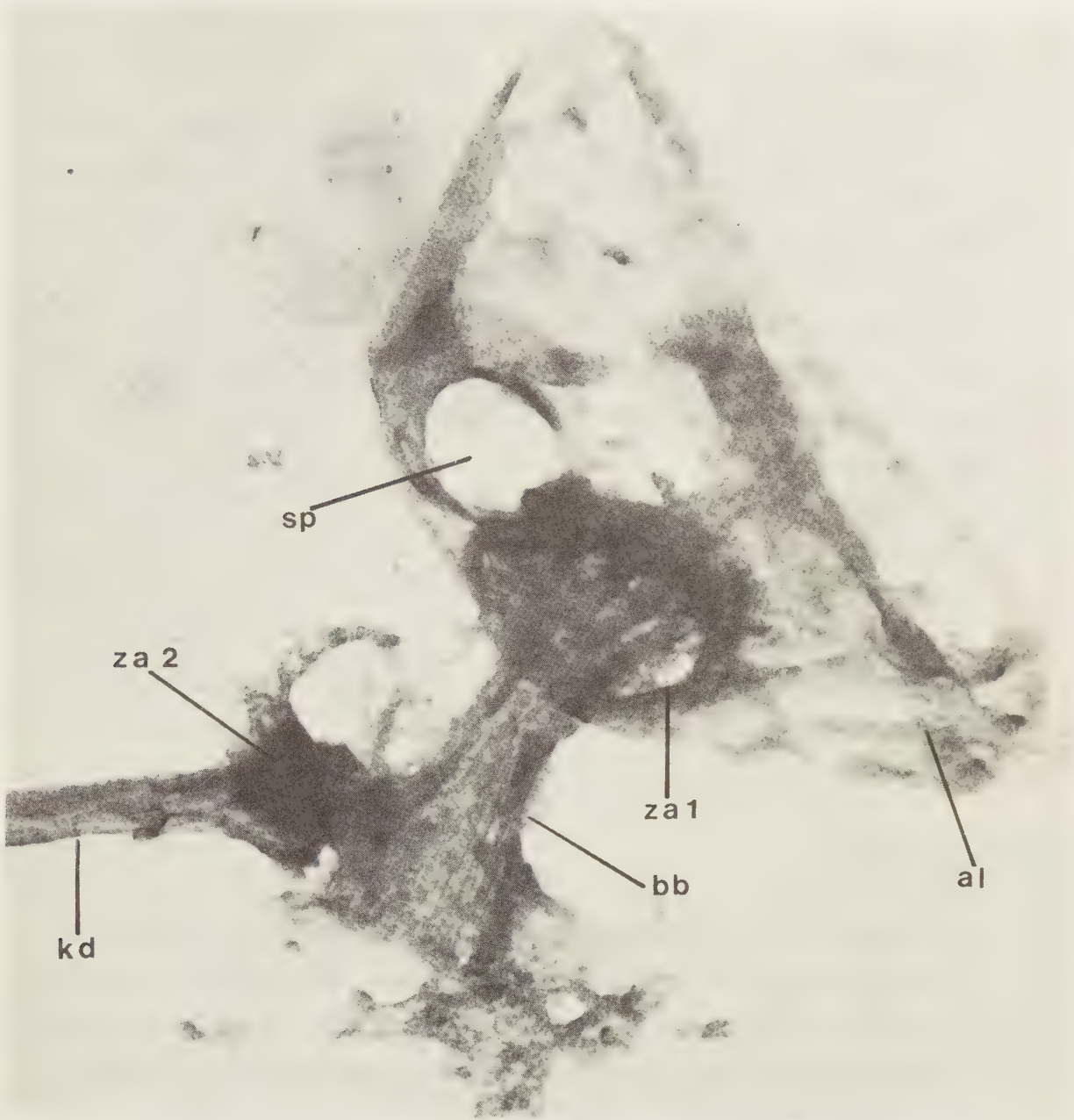


Fig. 15. Aspect d'un complexe cinétosome-cinétodesme - fragment alvéolaire.

bb : cinétosome kd : cinétodesme
 za 1 : zone d'ancrage cinétosome - épiplasma
 za 2 : zone d'ancrage cinétodesme - cinétosome
 al : fragment alvéolaire
 sp : sac parasomal = perforation régulière de l'alvéole et
 de l'épiplasma.

Méthode d'adhésion (II.7.1.) x 100.000

III.2. SEPARATION ET PURIFICATION DE STRUCTURES CORTICALES ISOLEES OU EN GROUPES

Différentes techniques de centrifugation furent employées pour séparer et purifier des cinétosomes ou cinétodesmes individuels, qui ont pu se détacher de la pellicule. Dans l'exemple II.3.1.1., on trouve des cinétosomes et cinétodesmes dans plusieurs culots (500 g, 6000 g, 15000 g). Dans ce type de séparation comme dans tous les autres que j'ai essayés, les organelles corticales isolées ont montré un comportement anormal et irrégulier. Ces essais furent abandonnés.

Les bouches et les pellicules isolées furent également soumises à divers types de CF dans un but de purification. Les CF où les fractions sont déposées sur un milieu dense (II.3.2., II.3.3.) ou sur un gradient discontinu de saccharose (II.3.1.2.) permettent une bien meilleure purification que les CF différentielles (II.3.1.2., II.3.2.).

III.3. DISCUSSION

Les résultats de fragmentation corticale, en vue d'isoler des cinétosomes et des cinétodesmes individuels, peuvent être comparés à une série de travaux antérieurs. Tous les investigateurs qui ont isolé et purifié les pellicules par la méthode alcool-digitonine (16, voir introduction) ont eu de la peine à les fragmenter : ils ont obtenu, soit des cinétosomes partiellement désintégrés (11, 13), soit des cinétosomes attachés à des cinétodesmes (12, 14, 15) et (ou) à des lambeaux d'épiplasme (12, 14). Ce résultat semblait s'expliquer par une stabilisation excessive de la pellicule par l'éthanol. Les observations faites dans ce travail montrent que la stabilisation peut se produire même en l'absence d'éthanol. Des pellicules isolées et purifiées en présence d'EDTA (ou EGTA) sont aussi difficiles à fragmenter. Finalement, même des pellicules non stabilisées qui se décomposent spontanément pendant la lyse cellulaire, ne libèrent pas des cinétosomes et des cinétodesmes individuels. Cette dernière observation révèle que les facteurs empêchant

la libération des cinétosomes et cinétodesmes individuels sont intrinsèques à la pellicule : ce sont les zones de jonction cinétosome-épiplasma et cinétosome-cinétodesme, qui sont plus solides structurellement que les organelles elles-mêmes.

L'isolement des bouches pose peu de problèmes, car ces ensembles structurels sont stables même dans l'eau distillée (21). L'isolement des pellicules est plus difficile, car il faut un milieu adéquat pour empêcher leur fragmentation. A part l'éthanol, plusieurs investigateurs ont utilisé l'hexylène glycol 1 M (19) ou l'EDTA (22-24) pour isoler des pellicules, mais sans mentionner le rôle stabilisant de l'agent chélateur. La purification des bouches et des pellicules est facilitée par l'emploi de milieux denses (solutions concentrées de saccharose) pour la centrifugation. Ce type de milieu a été sélectionné également par la plupart des investigateurs (18-22), de même que la solubilisation par le Triton X-100 (20,21). Cette dernière améliore sensiblement les conditions de séparation et de purification, en dégradant la majorité des organelles sub-cellulaires contaminantes.

CHAPITRE IV

MISE EN EVIDENCE DE QUELQUES PROTEINES CORTICALES MAJEURES
DANS LES BOUCHES ET LES PELLICULES PURIFIEES

IV.1. ULTRASTRUCTURE DES BOUCHES ET DES PELLICULES PURIFIEES

Dans les bouches purifiées par la méthode II.3.2., la membrane limitante externe (Pl), les sacs alvéolaires et l'épithélium sous-jacent (I.1.3.) sont absents. Ces structures ont été extraites par le milieu d'isolation. Tout le fond de la bouche et le cytopharynx, ainsi que la zone des ribs, sont également absents.

Les membranelles et l'UM tiennent ensemble uniquement par leurs connexions microfilamenteuses et microtubulaires. La fig. 16 montre un exemple de connexion membranaire (I.1.3.) formée d'un faisceau de microtubules. A l'intérieur des membranelles et de l'UM, des réseaux de microfilaments sont disposés entre les cinétosomes. A leur niveau distal, ils forment une sorte de feutrage. Celui-ci est plus épais dans les membranelles (fig. 17) que dans l'UM (fig. 18). Au niveau moyen et proximal des cinétosomes de l'UM et des membranelles, les microfilaments forment des réseaux moins denses.

Tous les cinétosomes de la bouche isolée sont sur leur plus grande longueur, composés de doublets au lieu de triplets. La plus grande partie du microtubule C (celui qui ne continue pas dans l'axonème ciliaire) est donc extraite pendant l'isolement des bouches. Il en est de même pour le cartwheel et les structures internes du cinétosome.

Les pellicules isolées n'ont plus ni membrane limitante externe (Pl) ni sacs alvéolaires. Par contre, elles conservent leur épithélium qui assure leur continuité (fig. 19, 20). Les pellicules sont débarrassées des mucocystes et des organelles intracytoplasmiques. Elles sont dépourvues de cils, sauf dans la région buccale. Les cils buccaux sont privés de leur membrane (correspondant à Pl).

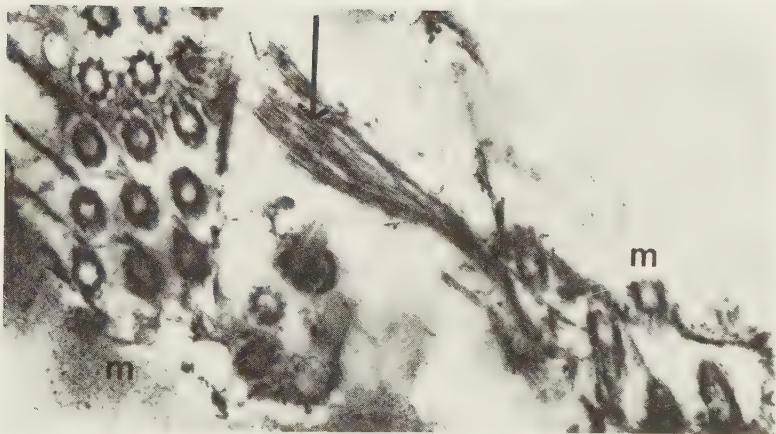


Fig. 16. Connexions microtubulaires (flèches) entre deux membranelles.

m : membranelle

Méthode II.7.2. x 18.000

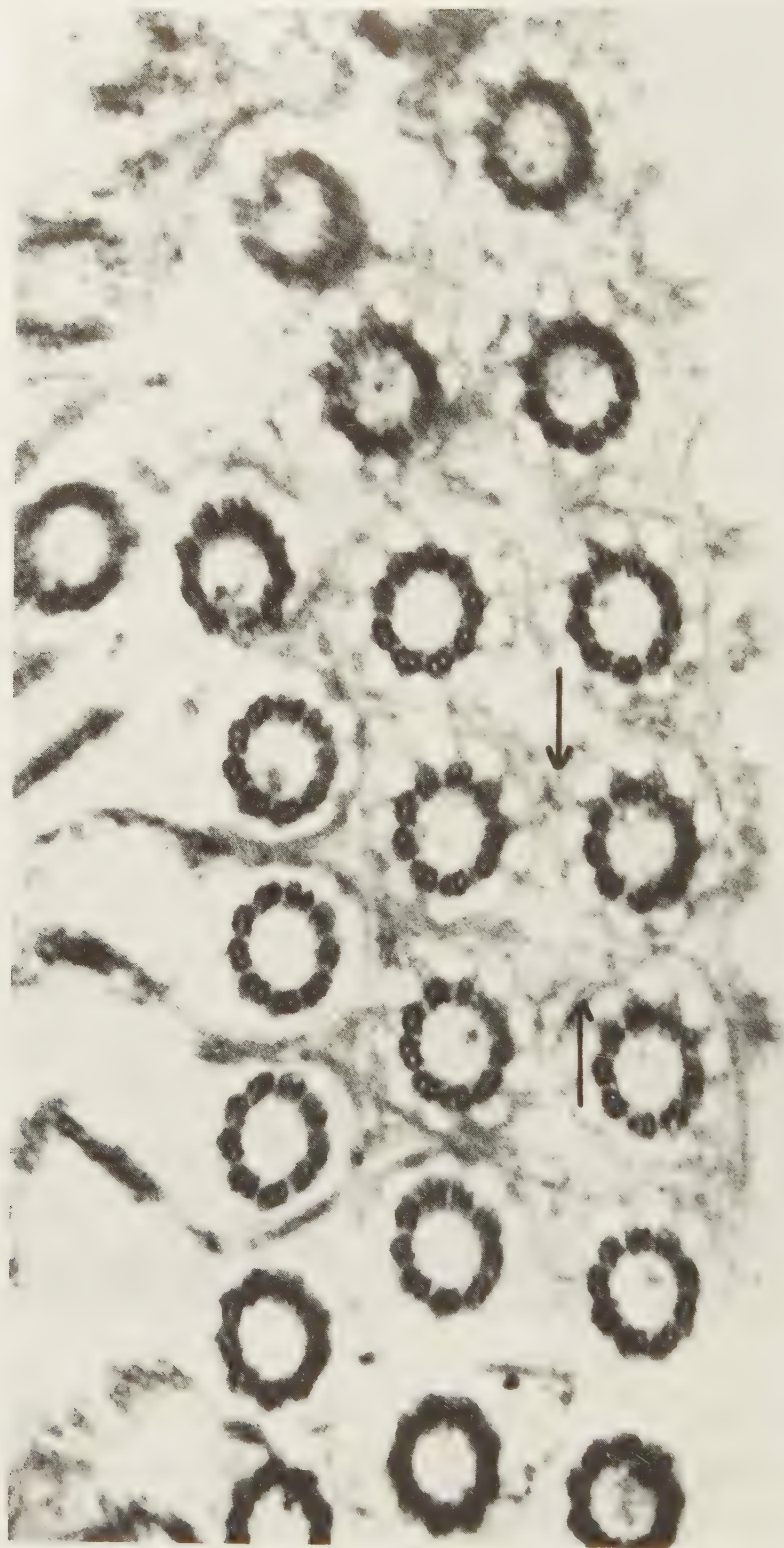


Fig. 17. Détail d'une membranelle au niveau des plaques terminales.
Les microfilaments (flèches) forment un feutrage entre les
plaques.

Méthode II.7.2. x 70.000



Fig. 18. Détail de l'UM (membrane ondulante) composée de deux rangées de cinétosomes. La rangée de droite (RD) n'a jamais de cil. La rangée de gauche (RG) est cilifère. Des réseaux de microfilaments (flèches) entourent la partie distale des cinétosomes.

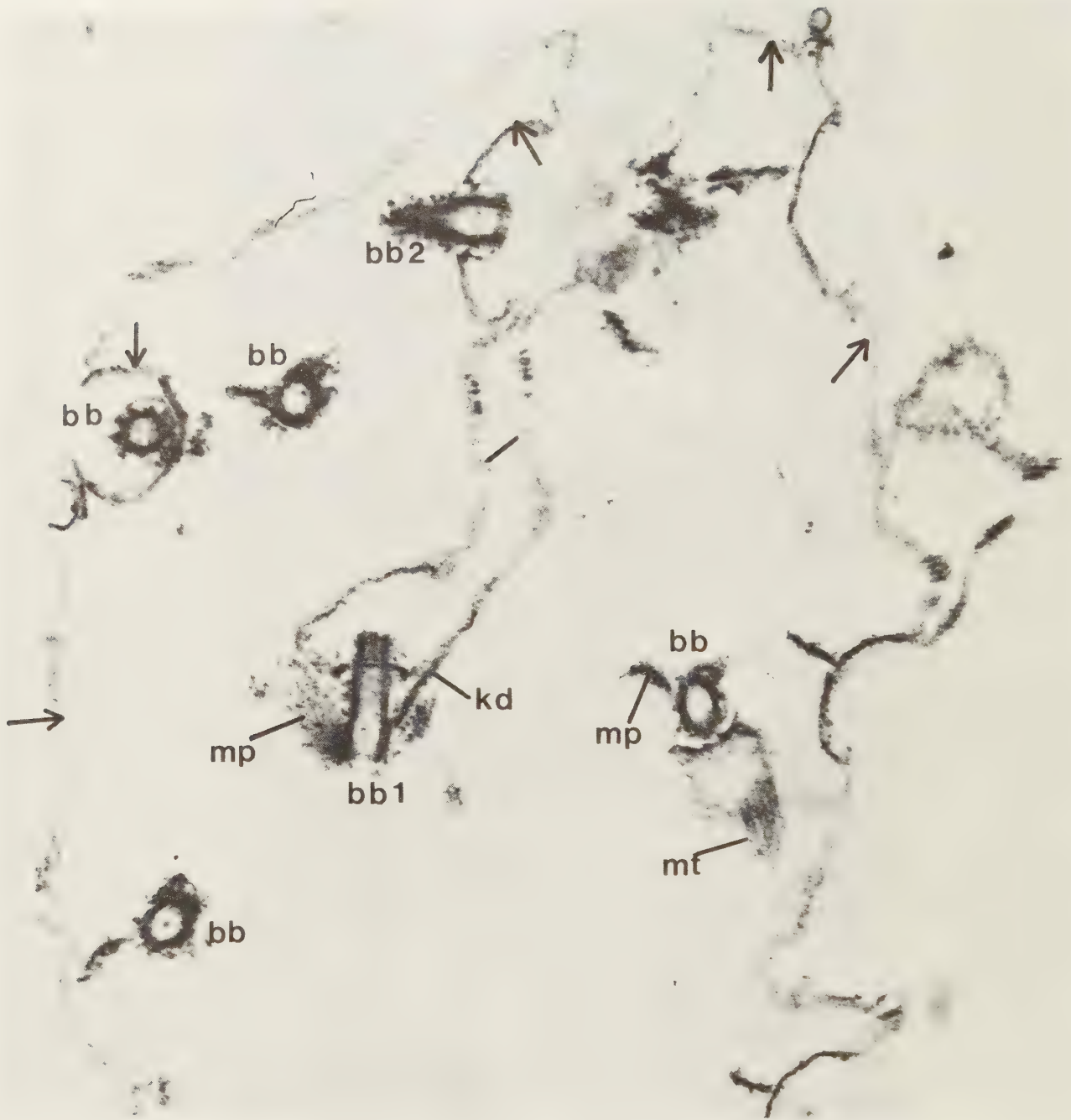


Fig. 19. Coupe tangentielle d'une pellicule purifiée : bb 1 et bb 2 ont subi une rotation et sont coupés longitudinalement. Les flèches indiquent la position de l'épiplasme. On remarque l'absence de P1, P2 et P3. (Comparer avec fig. 4 et 6).

bb : cinétosome

mt : faisceaux microtubulaires transverses

mp : faisceaux microtubulaires postérieurs

kd : cinétodesme

Méthode II.7.2.

x

30.000

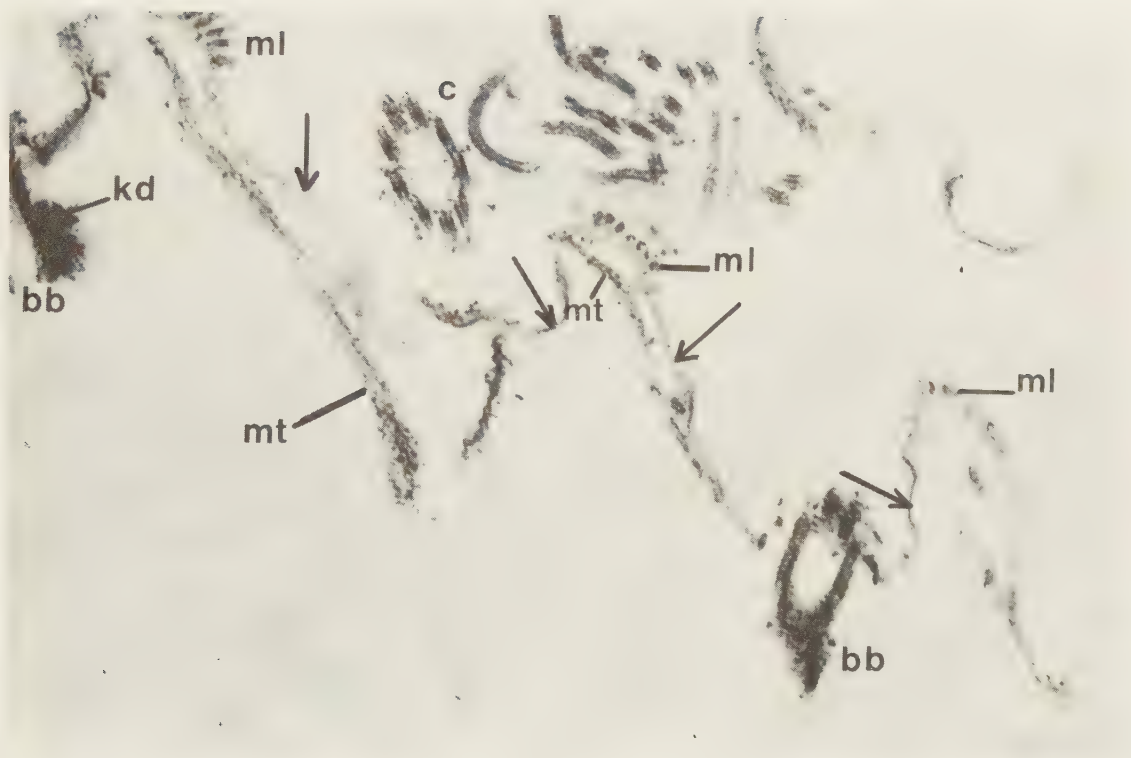


Fig. 20. Coupe transversale d'une pellicule purifiée. Les flèches indiquent la position de l'épiplasme.

bb : cinétosome

kd : cinétodesme

mt : faisceaux microtubulaires transverses

ml : faisceaux microtubulaires longitudinaux

c : microtubules ciliaires

Méthode II.7.2. x 42.000

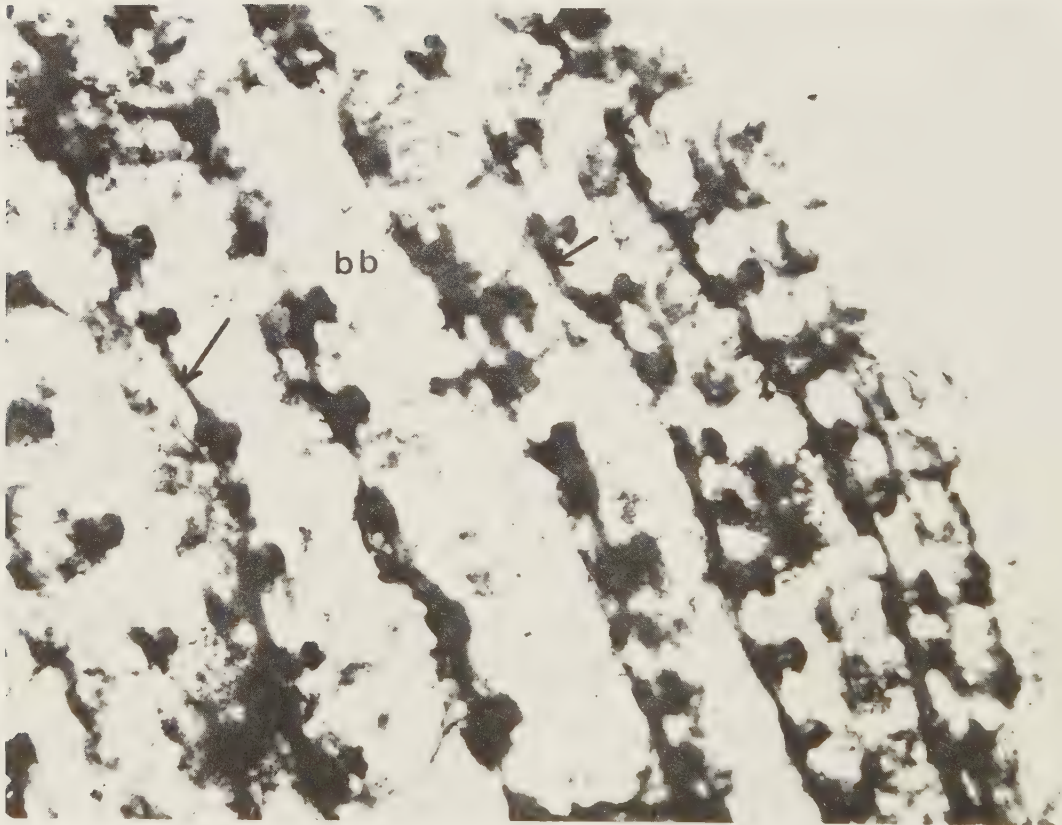
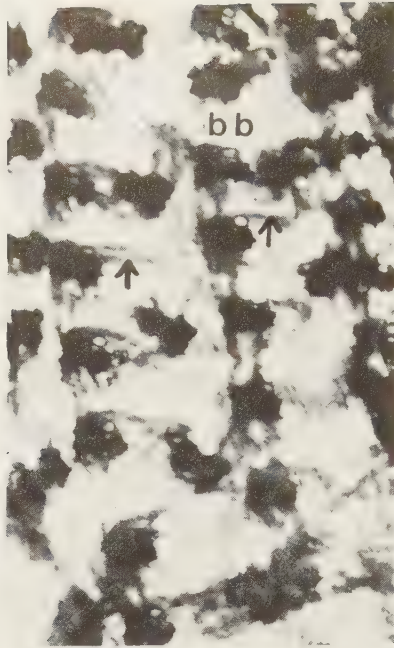


Fig. 21. Deux aspects des pellicules purifiées, vues par la méthode II.7.1. Les cinétosomes (bb) sont très foncés.
 En haut : les flèches montrent la position des faisceaux microtubulaires transverses.
 En bas : les flèches montrent la position des cinétosomes.

x 12.000

Les fibres infraciliaires sont présentes et réussissent souvent à maintenir leur orientation primitive (fig. 21). Les cinétodesmes (fig. 21) semblent amincis par rapport à leur forme habituelle. Ils sont davantage modifiés que les faisceaux transverses (fig. 21), postciliaires (fig. 19) et longitudinaux (fig. 20). Quant aux microtubules basaux, ils sont absents des pellicules isolées. En résumé, les bouches isolées sont riches en microtubules, microfilaments et plaques terminales. Les pellicules renferment ces éléments puisqu'elles contiennent les bouches. De plus, elles sont riches en épiplasme et en cinétodesmes.

IV.2. PROTEINES CORTICALES MAJEURES

Les bouches et les pellicules purifiées sont facilement solubilisées dans le tampon d'échantillon du système SDS (II.4.1.). Après électrophorèse sur gel SDS*, les gels colorés révèlent plusieurs groupes de protéines majeures (fig. 22, 23). Les pellicules en ont quatre, les bouches deux. Le groupe I contient la bande A, le groupe II les bandes B et C, le groupe III les bandes D et E, le groupe IV la bande F. Les bandes A à F disparaissent des gels colorés si on fait un prétraitement des pellicules isolées à la Pronase ou à la Trypsine purifiées. Deux méthodes furent utilisées pour savoir si les bandes A à F sont des protéines corticales :

- 1) l'observation, en microscopie ordinaire (II.6.) et électronique (II.7.), du niveau de contamination des bouches et pellicules purifiées. Les bouches ont très peu de contaminants; les pellicules sont seulement contaminées par des cils isolés.
- 2) la comparaison par électrophorèse des protéines présumées des bouches et pellicules avec celles de divers contaminants éventuels.
 - a) A la fin de la dernière étape de purification buccale (II.3.2.), les protéines du mélange (zone C + culot) sont comparées (fig. 24, 25) à celles du mélange (zone A + zone B). La micros-

* Cette expression raccourcie signifie gel de polyacrylamide dans le système SDS.

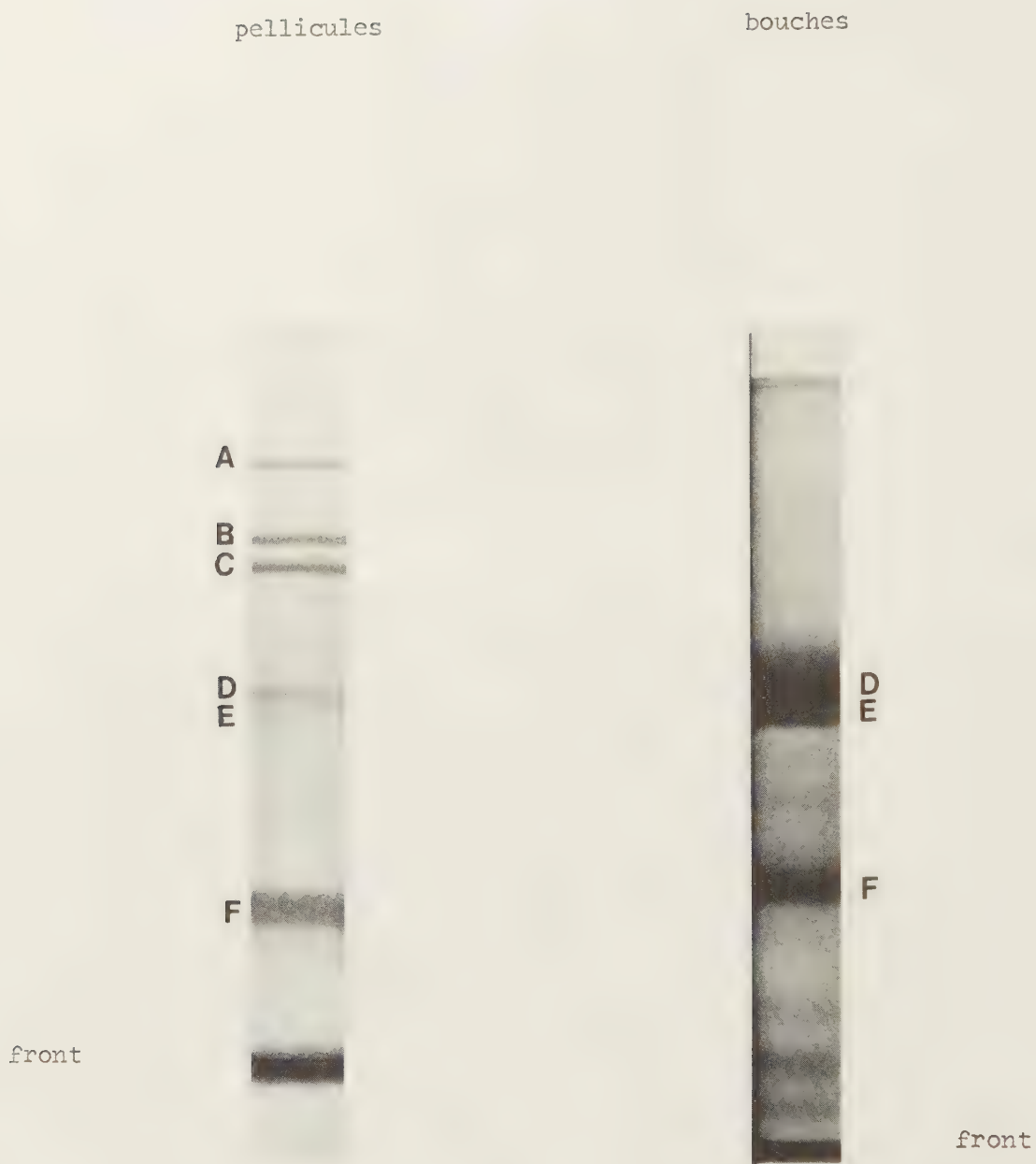


Fig. 22. Protéines majeures des pellicules et bouches purifiées.
 Les gels SDS ont 7,5 % de polyacrylamide. Les différences de mobilité relative pour D, E et F dans les deux gels sont dues à une légère différence dans la concentration de bisacrylamide.
 Méthode II.4.1.

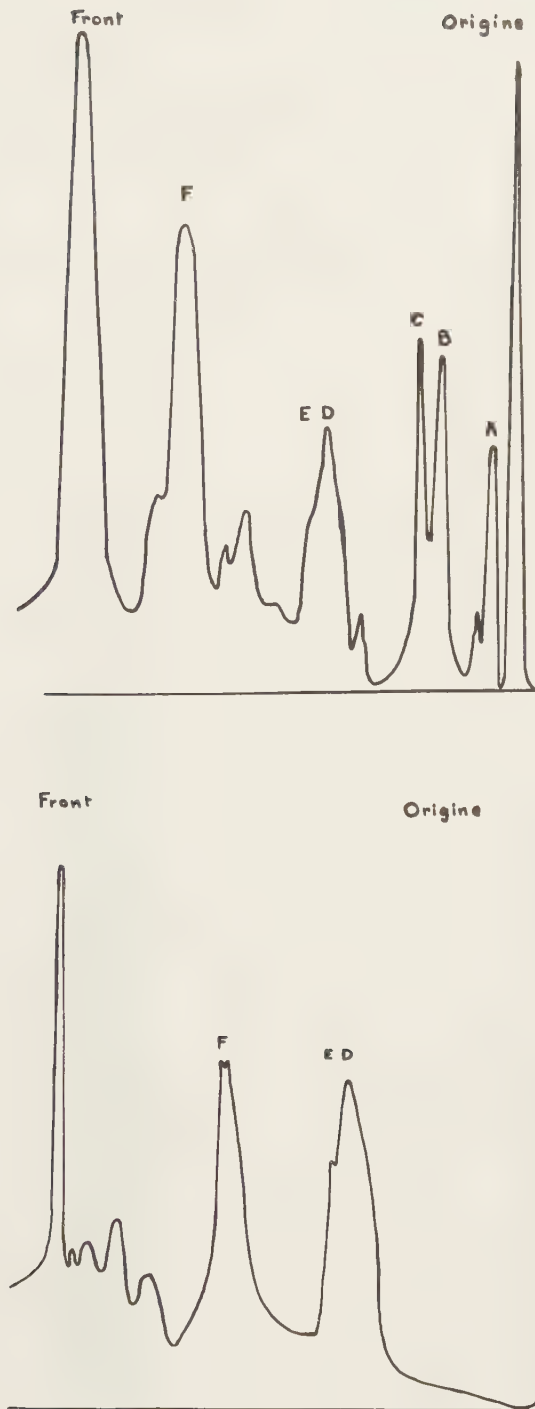


Fig. 23. Tracés densitométriques des gels de la fig. 22.

Le tracé d'en haut représente les protéines des pellicules purifiées.

Le tracé d'en bas représente les protéines des bouches purifiées.

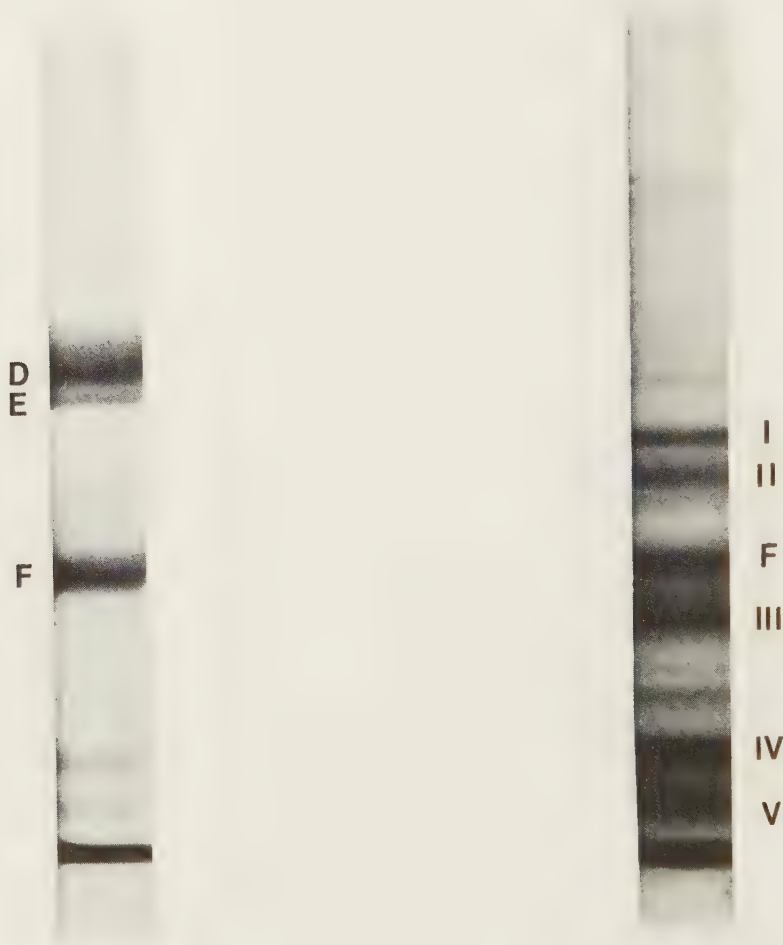
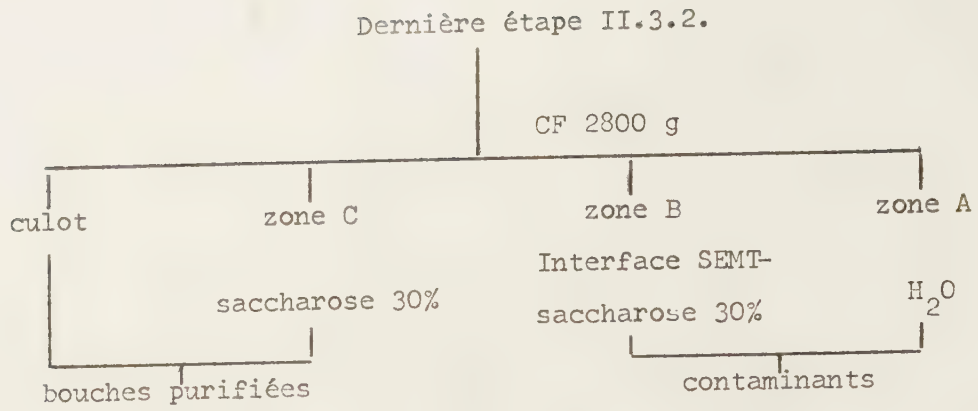


Fig. 24. Protéines majeures d'une fraction riche en bouche et d'une fraction riche en contaminants. Les gels SDS ont 7,5 % de polyacrylamide.
Méthode II.4.1.

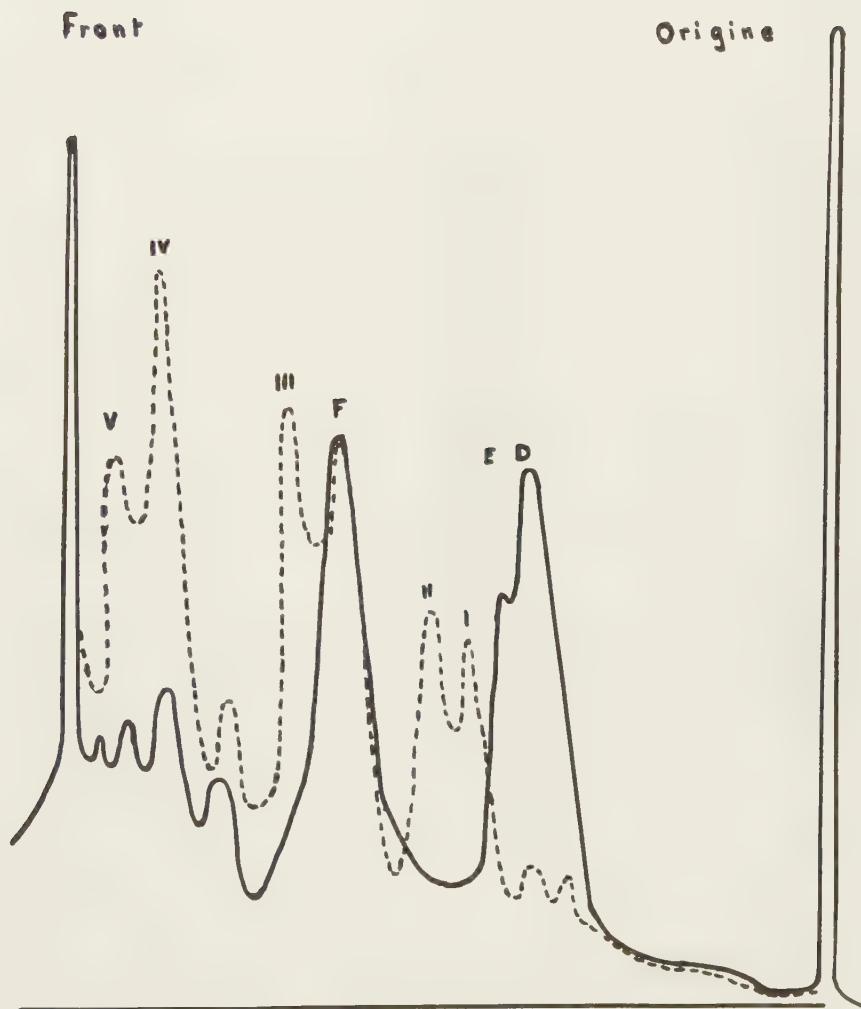


Fig. 25. Tracés densitométriques des gels de la fig. 24.

Le tracé continu représente les protéines des bouches purifiées.

Le tracé en pointillé représente les protéines des contaminants.

copie ordinaire indique que le mélange (A + B) est pauvre en bouches et riche en contaminants de petite taille, alors que le mélange (C+culot) est riche en bouches et pauvre en contaminants. Le contenu protéique des deux mélanges est également différent (fig. 24, 25). Les protéines majeures (I à V) du mélange A + B sont en quantité très réduite dans le mélange (C+culot). Les conclusions les plus apparentes sont :

- les protéines des bandes D et E sont essentiellement des protéines buccales.
- les protéines des bandes I à V sont essentiellement des protéines des contaminants.

Ces conclusions sont valables pour autant que :

- les protéines des bandes D et E ne soient pas celles de contaminants invisibles en microscopie ordinaire et électronique. Ces contaminants seraient des protéines solubles s'adsorbant sélectivement sur les bouches, ou des structures ayant un coefficient de sédimentation proche des bouches.
- les protéines des bandes I à V ne soient pas des protéines buccales solubilisées pendant la resuspension dans H_2O (II.3.2.).

- b) Les protéines des pellicules purifiées de la méthode II.3.3. sont comparées à celles de la zone A (SEMT) de la 1ère étape de purification. Celle-ci contient la plupart des organelles sub-cellulaires (dégradées par l'action solubilisante du milieu SEMT+Triton X-100) et l'ensemble des protéines solubles du cytoplasme. La zone A ne contient aucune protéine majeure comparable à celles des bandes A à E. (fig. 26).
- c) Les protéines de diverses structures subcellulaires, plus ou moins purifiées (II.3.4. à II.3.6.) sont séparées par électrophorèse sur gel SDS (voir fig. 27). Les cils, mitochondries et microsomes ne contiennent aucune protéine décelable correspondant à celles des bandes A à E. Seules les fractions riches en noyaux (II.3.5.) contiennent des protéines correspondant à D et E. Ces protéines sont en quantité mineure et peuvent parfaitement provenir des bouches qui contaminent la fraction nucléaire. En revanche, les fractions riches en noyaux ne contiennent

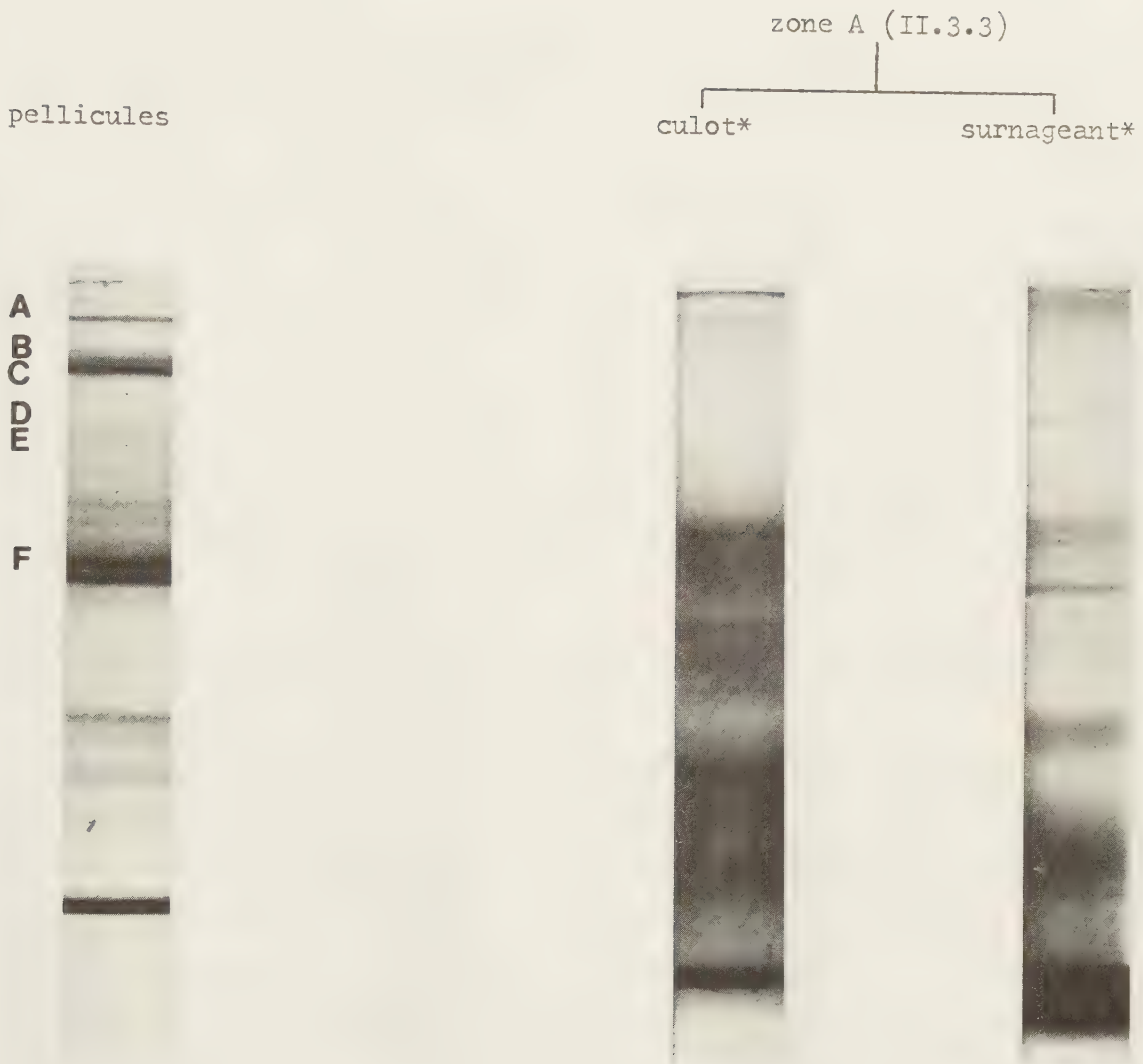


Fig. 26. Comparaison des protéines de pellicules purifiées à celles du surageant (zone A) de la 1ère étape de II.3.3. Les gels SDS contiennent 10 % de polyacrylamide. Méthode II.4.1.

* la zone A a été dialysée contre une solution saline (20 mM Tris-HCl pH 7,5) puis centrifugée à 109.000g 2h.

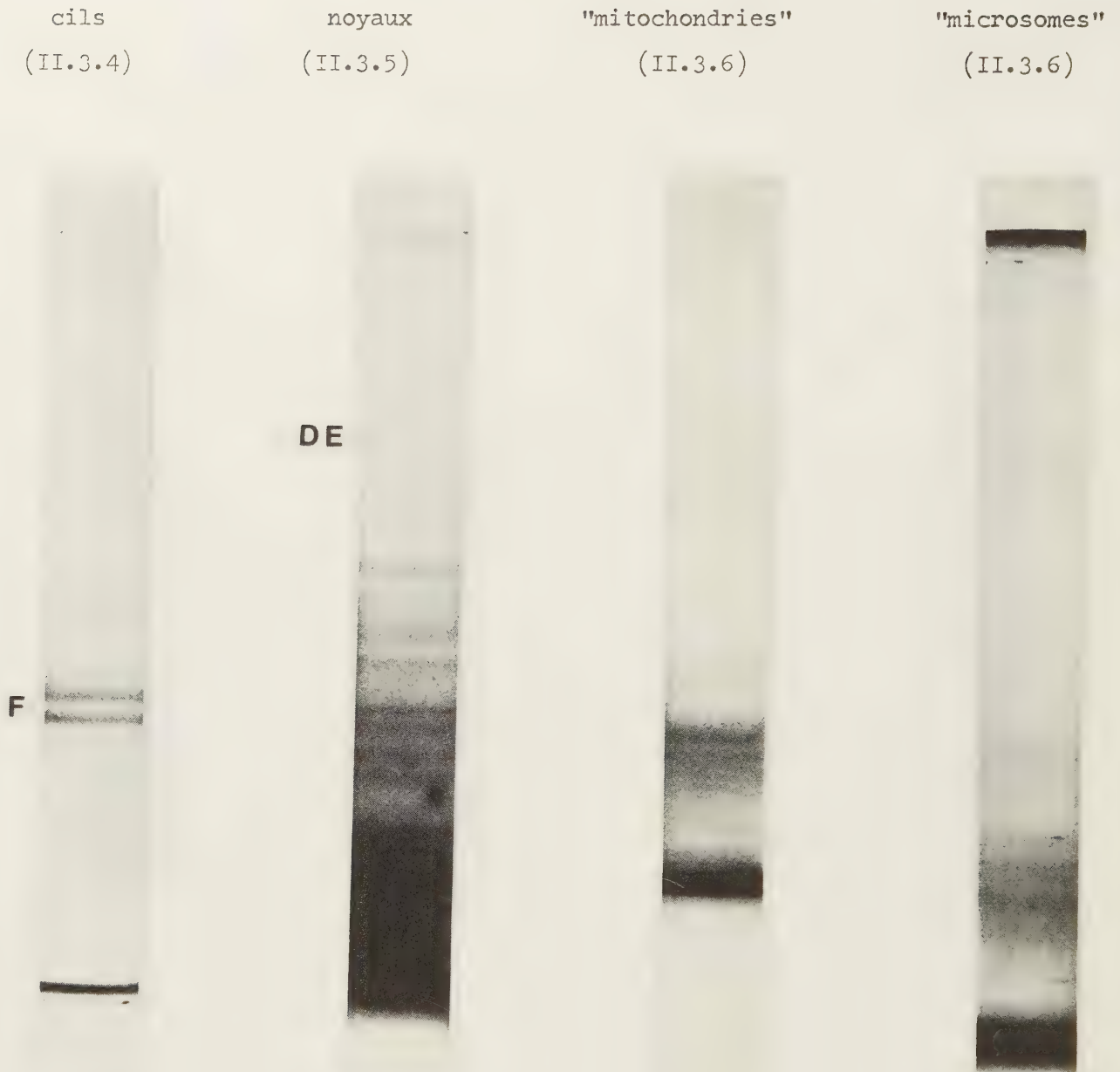


Fig. 27. Contenu protéique de diverses fractions subcellulaires.

Les gels SDS ont 7,5 % de polyacrylamide. Méthode II.4.1.

aucune protéine décelable correspondant à celles des bandes A à C.

En conclusion, les protéines des bandes A à C apparaissent comme spécifiquement corticales. Les protéines des bandes D et E sont également corticales, quoiqu'il n'est pas exclu qu'elles apparaissent aussi dans les noyaux. La provenance corticale des protéines de la bande F sera démontrée plus loin (IV.4).

Les électrophorèses sur gel SDS contenant 12,5 % de polyacrylamide montrent l'absence de bandes majeures constituées par des protéines plus légères que F (fig. 28). Une grande partie des protéines situées dans les pellicules et les bouches (purifiées selon II.3.2. et II.3.3.) est renfermée dans les bandes A à F.

IV.3. DETERMINATION DU POIDS MOLECULAIRE DES PROTEINES MAJEURES DU CORTEX

Les poids moléculaires sont calculés à partir des mobilités relatives (électrophorétiques) des protéines dans les gels SDS (voir II.4.2.). Les mesures sont faites dans deux concentrations de polyacrylamide (7,5 % et 10 %). Les noms et les PM des cinq protéines de références sont énumérés à la table 2.

Les meilleurs résultats sont obtenus avec des gels contenant 7,5 % de polyacrylamide. La fig. 29 montre les mobilités relatives moyennes des cinq protéines de référence, en fonction du log de leur PM. L'ensemble des mesures individuelles (vingt en tout) a servi à calculer l'équation de la droite de régression dessinée sur la fig. 29.

Les écarts des moyennes par rapport à la droite de régression sont très faibles. A partir des mobilités relatives moyennes, il est possible de calculer les PM expérimentaux des protéines de référence tels qu'ils sont donnés par la droite de régression. Ces valeurs figurent dans la colonne PM (droite) de la table 1. Les erreurs relatives obtenues sur le PM sont inférieures à 3 %. La table I montre ensuite les PM calculés pour les protéines corticales D, E, F1 et F2 (les deux sous-bandes de F). Les écarts-types expriment seulement la variabilité des mesures individuelles autour de leur moyenne. L'écart existant entre les valeurs données

Pellicules

Bouches



Fig. 28. Gels SDS contenant 12,5 % de polyacrylamide. On peut remarquer que la majorité des protéines ont une mobilité inférieure ou égale à F. Elles ont donc un PM supérieur ou égal à 48.000. La bande V dans le gel des bouches est probablement un contaminant (fig. 24).

TABLE 2

Mesure du poids moléculaire des protéines dans des gels SDS contenant 7,5 % ou 10 % de polyacrylamide.

	PM littérature ₁	PM (droite) ₂ dans 7,5% polyacr.	PM (droite) ₂ dans 10 % polyacr.	erreur relative ₃ dans 7,5% polyacr.	erreur relative ₃ dans 10 % polyacr.
PROTEINES DE REFERENCE					
Glycéraldéhyde-PO ₄ déshydrogénase	36.000	35.200	35.000	- 2,3 %	- 2,8 %
Ovalbumine	43.000	44.300	---	+ 2,9 %	---
Catalase	60.000	58.700	62.000	- 2,2 %	+ 3,2 %
Sérumalbumine bovine	68.000	69.200	69.900	+ 1,7 %	+ 2,8 %
Phosphorylase	94.000	93.100	90.500	- 1 %	- 4 %
PROTEINES DE <u>TETRAHYMENA</u>					
D		87.500 (+400)	86.100 (+700)		
E		83.400 (+400)	84.300 (+500)		
F1		51.200 (+300)	56.500 (+200)		
F2		48.700 (+200)	52.300 (+300)		

1. PM estimé par différentes méthodes physico-chimiques

2. PM apparent dans le système SDS glacé sur la droite de régression

3. $\frac{(\text{PM litt.} - \text{PM droite})}{\text{PM litt.}}$

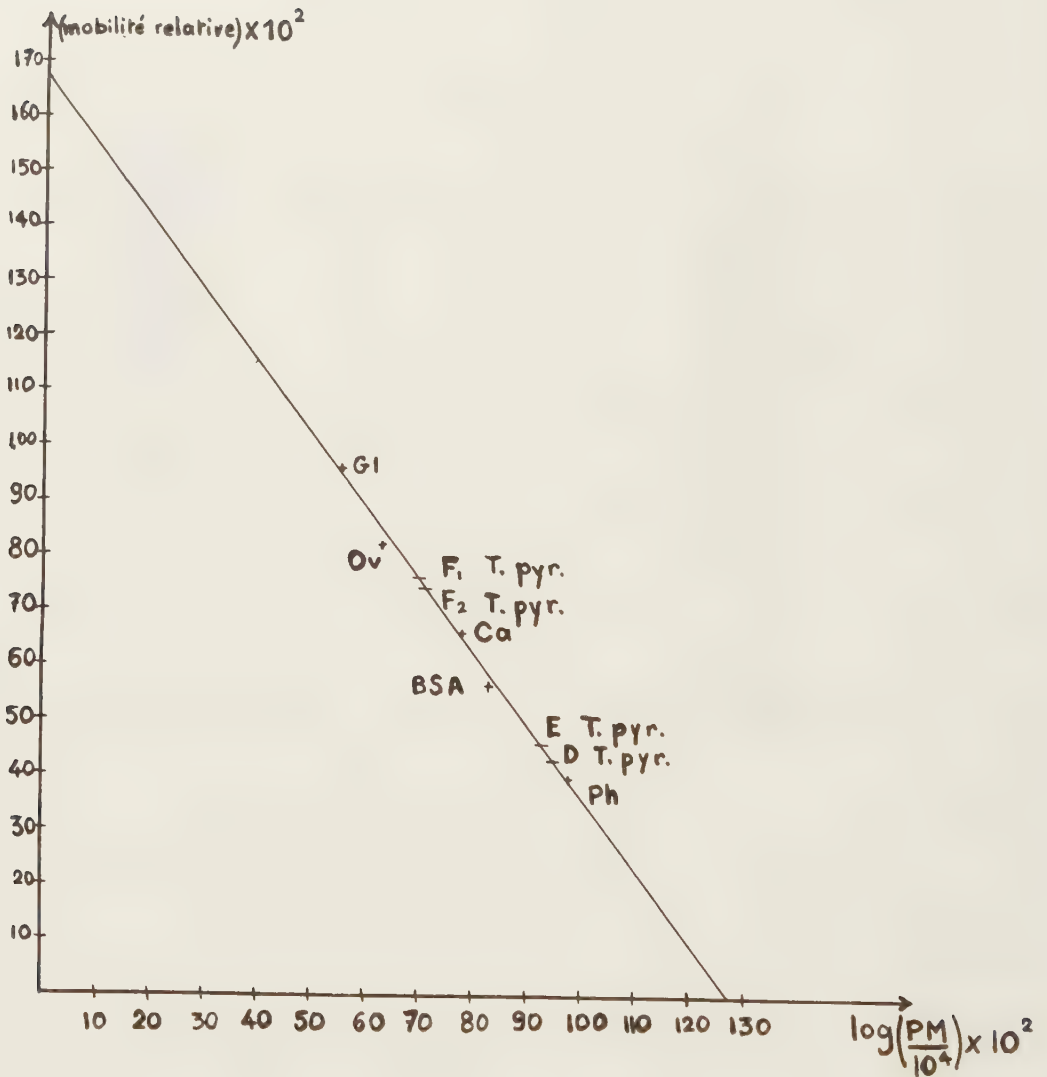


Fig. 29. Relation entre la mobilité relative et le logarithme du poids moléculaire dans un gel SDS contenant 7,5 % de polyacrylamide. Méthode II.4.1.

Gl : Glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase

Ov : Ovalbumine

Ca : Catalase

BSA : Sérumalbumine bovine

Ph : Phosphorylase

par la droite de régression et les valeurs réelles de PM est bien sûr impossible à déterminer sur la fig. 29. Les résultats obtenus avec des gels contenant 10 % de polyacrylamide apparaissent dans la fig. 30 et la table 2. Les erreurs relatives sur les PM des protéines de référence sont un peu plus fortes qu'avec les gels 7,5 %, en utilisant la technique de la droite de régression. La disposition des points autour de la droite de régression montre la possibilité d'une relation légèrement hyperbolique entre les mobilités relatives et le log PM. Pour les protéines des bandes D et E, les valeurs de PM données par la droite de régression sont proches des valeurs de la table 2. Par contre, pour F1 et F2, les PM sont sensiblement plus élevés que ceux donnés par les gels contenant 7,5 % de polyacrylamide. L'examen de la fig. 30 nous montre qu'une courbe légèrement hyperbolique passant plus près des points des protéines de référence, diminuerait les PM des protéines de F1 et F2.

Les mobilités relatives des protéines des bandes A à C ne sont pas comprises entre celles des protéines de référence. Le PM de ces protéines ne peut donc pas être déterminé à l'aide de la droite de régression, car la linéarité de cette droite n'est pas garantie au-delà des PM de référence.

Toutes les déterminations de PM décrites ci-dessus furent effectuées sur des protéines dénaturées et réduites par le mercaptoéthanol. Ce traitement devait garantir que les protéines des bandes A à F soient constituées d'une seule chaîne d'acides aminés (33). L'intégralité de la dénaturation fut vérifiée par l'expérience suivante :

Les protéines corticales furent dénaturées dans la guanidine-HCl 5 M et le mercaptoéthanol 0,1 M. Après dialyse contre le tampon d'échantillon du système SDS (II.4.1.), elles furent soumises à l'électrophorèse dans le système SDS. Le résultat indique une distribution des protéines corticales identique à celle des expériences effectuées sans l'étape de solubilisation dans la guanidine-HCl.

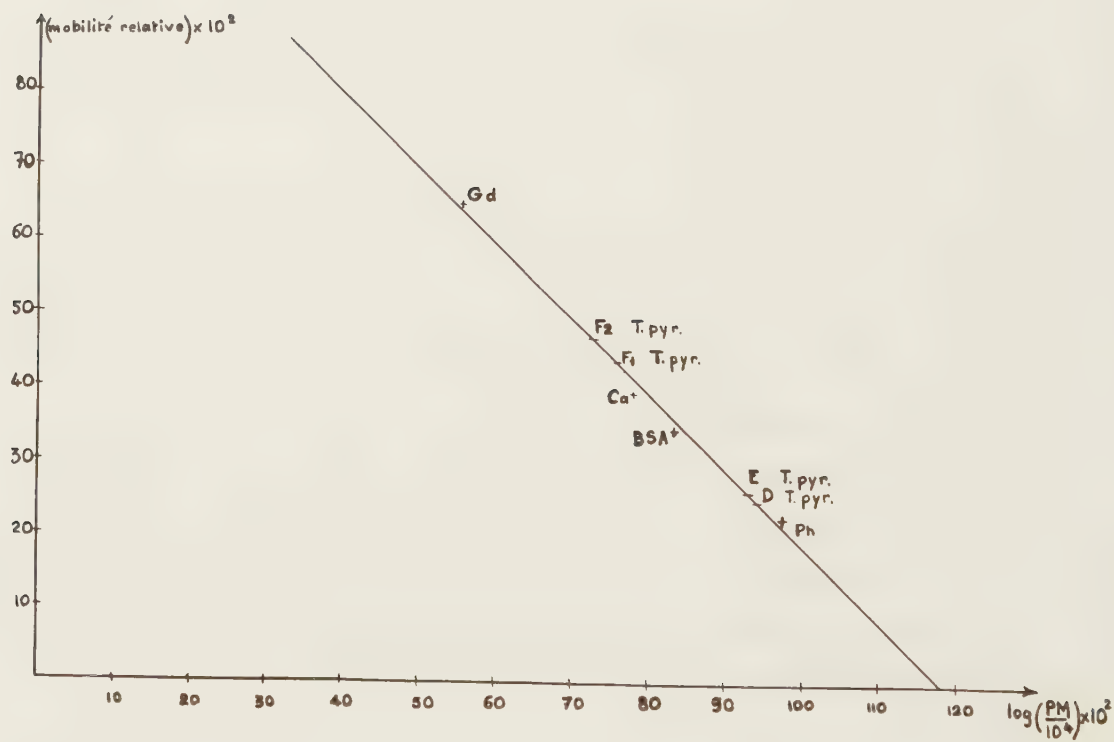


Fig. 30. Relation entre la mobilité relative et le logarithme du poids moléculaire dans un gel SDS contenant 10 % de polyacrylamide. Méthode II.4.1.

G1 : Glycéraldéhyde-phosphate déshydrogénase

Ca : Catalase

BSA : Sérumalbumine bovine

Ph : Phosphorylase

Les protéines corticales furent également analysées sur gel SDS après purification des pellicules par la méthode II.3.1.2. Les gels colorés montrent la présence de bandes protéiques identiques aux bandes A à F. La présence de Triton X-100 dans le milieu d'isolation II.3.2. et II.3.3. n'a donc pas d'influence sur le comportement ultérieur des protéines dans les gels SDS.

Une autre série expérimentale étudia la mobilité électrophorétique des protéines corticales dénaturées, mais non réduites. Les protéines corticales sont distribuées d'une façon identique dans les bandes A à F. Aucune nouvelle bande majeure n'apparaît. Ce résultat montre l'absence de ponts disulfures reliant entre elles des protéines corticales, identiques ou différentes, situées dans les bandes A à E. Seules les protéines non réduites de la bande F ont tendance à former une bande mineure supplémentaire, d'un PM apparent de 110.000. Cette bande mineure correspond à la réunion de deux sous-unités des protéines de F. La présence de ponts S-S existant naturellement entre ces deux sous-unités est cependant peu vraisemblable (voir discussion).

Le PM des protéines situées dans les bandes A à C a été estimé par comparaison avec un système monomère-polymère d'une protéine dénaturée dans le SDS, mais non réduite. La relation entre la mobilité relative et le log PM semble linéaire pour l'ovalbumine entre PM 130.000 et 340.000. Les mobilités relatives des protéines des bandes A à C étant identiques avec ou sans réduction, les valeurs de PM de ces protéines peuvent être estimées graphiquement (voir fig. 31). Ces valeurs figurent dans la table 3.

IV.4. ESSAIS DE LOCALISATION DES PROTEINES DES BANDES A A F DANS DES STRUCTURES DEFINIES DU CORTEX

Lorsqu'un mélange de protéines différentes appartient à un mélange de structures différentes, la corrélation protéine-structure ne peut s'établir que d'une manière indirecte (exception : méthodes d'identification immunologiques). Des corrélations sont partiellement établies entre les protéines des bandes A à F et les principales structures corticales (microtubules, microfilaments,

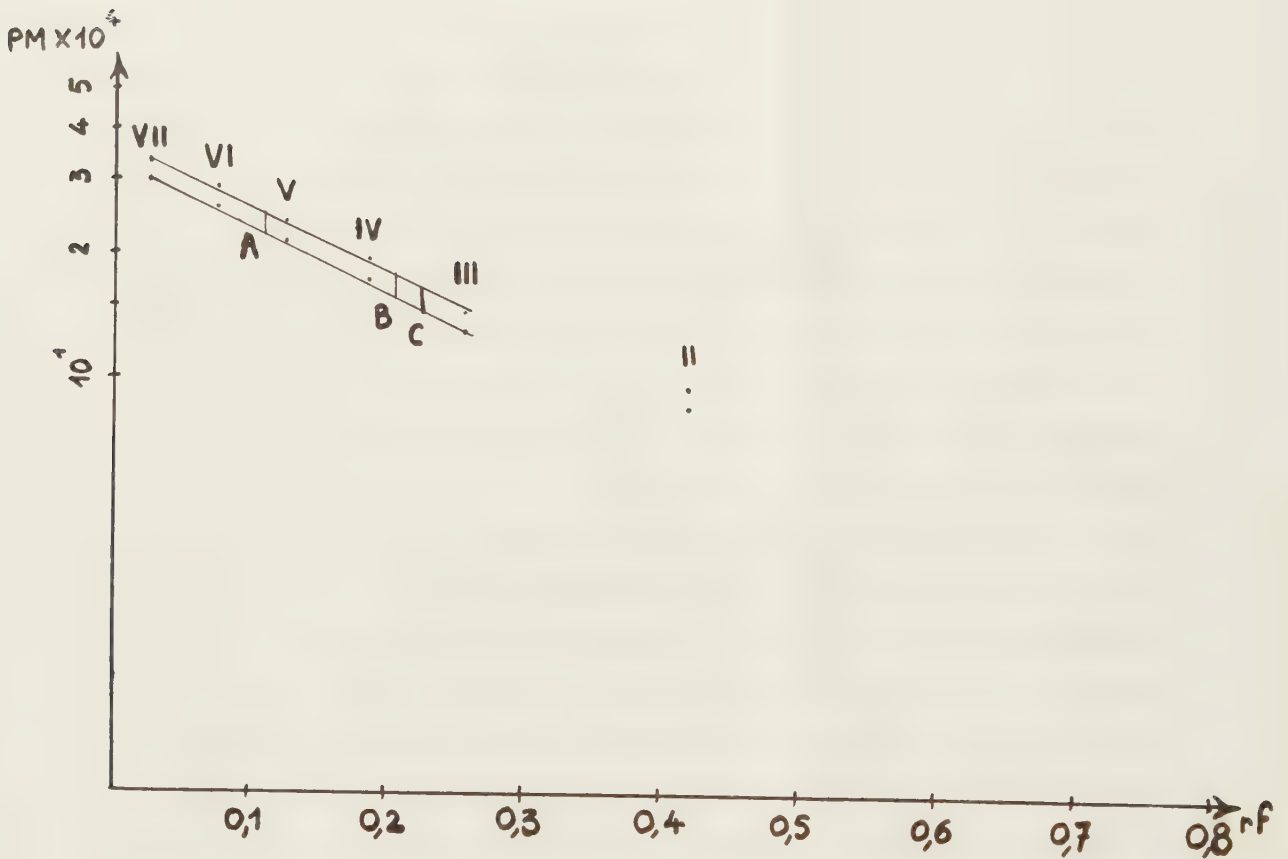


Fig. 31. Relation entre la mobilité relative et le logarithme du poids moléculaire dans un gel SDS contenant 7,5 % de polyacrylamide. L'ovalbumine n'a pas été traitée au 2-mercaptoéthanol et existe sous la forme monomère (non montré ici), dimère (II), trimère (III), tétramère (IV), pentamère (V), hexamère (VI), heptamère (VII), etc. La droite supérieure correspond à la note 1 de la table 3. La droite inférieure correspond à la note 2 de la table 3.

TABLE 3

Mesure du poids moléculaire des protéines dans un gel SDS contenant 7,5 % de polyacrylamide. Méthode II.4.1.

Protéines corticales	Valeur supérieure ₁	Valeur inférieure ₂
A	250.000	230.000
B	185.000	165.000
C	165.000	145.000

- 1) D'après la droite supérieure de la fig. 31 : tracée avec des valeurs qui sont les multiples du PM 48.000, donné pour l'ovalbumine non-réduite par Dunker et Rüeckert (34) dans le système SDS-polyacrylamide.
- 2) D'après la droite inférieure de la fig. 31 : tracée avec des valeurs qui sont les multiples du PM 43.000, donné pour l'ovalbumine non-réduite par Weber et Osborn (35) dans le système SDS-polyacrylamide.

plaques terminales, épiplasma, cinétodesmes) à l'aide de tests de solubilisation sélective (II.5.). Ces expériences sont résumées dans la table 4 et donnent les informations suivantes :

- a) les protéines de la bande F ont la même migration électrophorétique que les protéines majeures des cils. Elles sont extraites en grande partie par la haute force ionique (II.5.) en même temps que disparaissent les microtubules des cils, des bouches et des pellicules. Leur PM est compris entre 48700 et 56500. Elles se partagent en deux sous-bandes F1 et F2 d'égale intensité et de PM très semblables. Ces caractères identifient les protéines du groupe F à des tubulines, constituants protéiques majeurs des microtubules (voir discussion).
- b) les protéines des bandes D et E n'ont aucune corrélation avec les microtubules. Elles demeurent totalement insolubles, lorsque les microtubules disparaissent avec la haute force ionique. Les structures buccales laissées intactes par la haute force ionique sont les plaques terminales des cinétosomes et les réseaux de microfilaments. Ces deux types de structures permettent à la bouche de conserver sa forme générale après extraction par la haute force ionique.

Les protéines des bandes D et E sont fortement extraites par l'acide acétique 0,1 N. Dès le début du traitement, la plus grande partie de la structure buccale devient invisible en microscopie ordinaire. Parmi les fragments centrifugés et observés au M.E. par la méthode d'adhésion (II.7.1.) on ne trouve ni plaques terminales, ni microfilaments. Les particules amorphes du culot 15000 g observé au M.E. sont peut-être des agrégats de tubuline dénaturée, la seule bande majeure des protéines de ce culot étant la bande F.

En résumé, les protéines des bandes D et E sont localisées dans les régions non-microtubulaires de la bouche. Les expériences de solubilisation sélective ne permettent pas de dire si ces protéines sont situées dans les plaques terminales, dans les microfilaments ou dans ces deux ensembles structurels.

TABLE 4

Effets des tests de solubilisation sélective (II.5) sur les structures et les protéines corticales.

	milieu solubilisant	
	haute force ionique	acide acétique 0,1 N
PROTEINES CORTICALES MAJEURES		
bande A	+	+
bande B	-	+
bande C	+	+
bande D	-	+
bande E	-	+
bande F	+ en grande partie	- en grande partie
STRUCTURES <u>CORTICALES</u>		
microtubules	+	?
microfilaments	-	+
plaque terminales	-	+
épiplasme	+ en partie	+
cinétodesme	+	+

+ : solubilise

- : laisse insoluble

soluble dans
la haute force
ionique

insoluble dans
la haute force
ionique

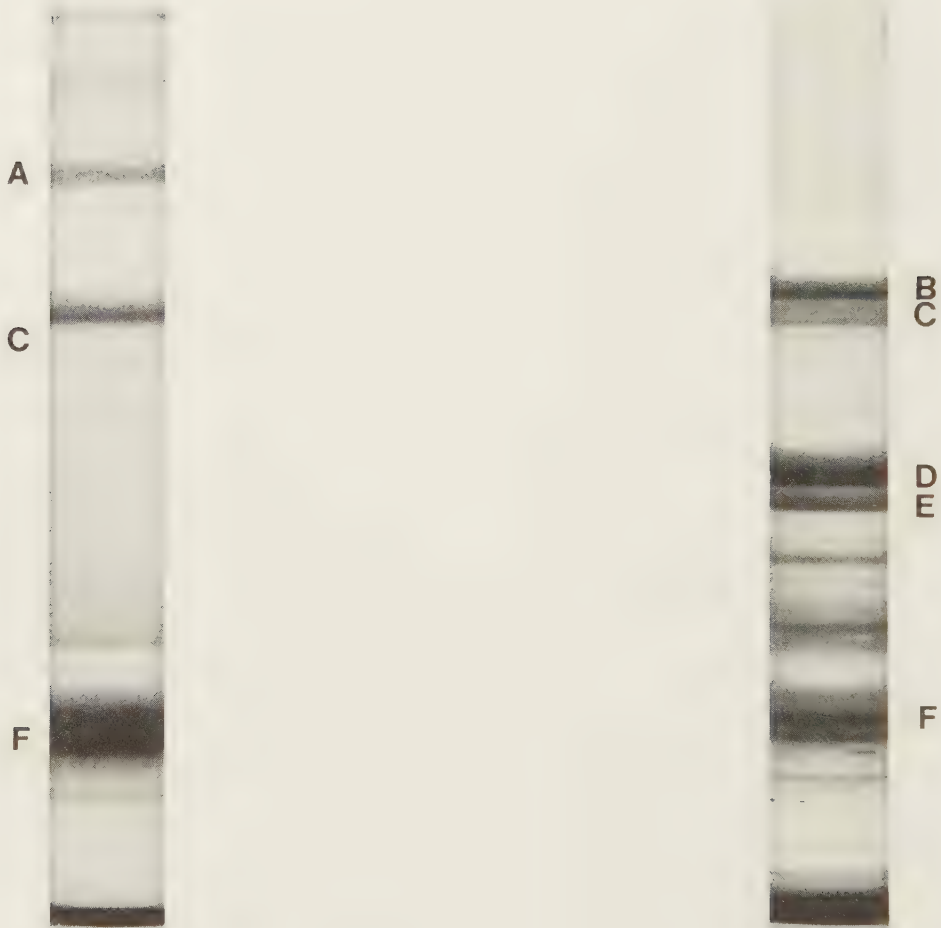


Fig. 32. Séparation des protéines pelliculaires en une phase soluble (voir II.5.) et une phase insoluble dans la haute force ionique (II.5.). Les gels SDS ont 7,5 % de polyacrylamide. Méthode II.4.1.

soluble dans
l'acide acétique
0,1 N

insoluble dans
l'acide acétique
0,1 N

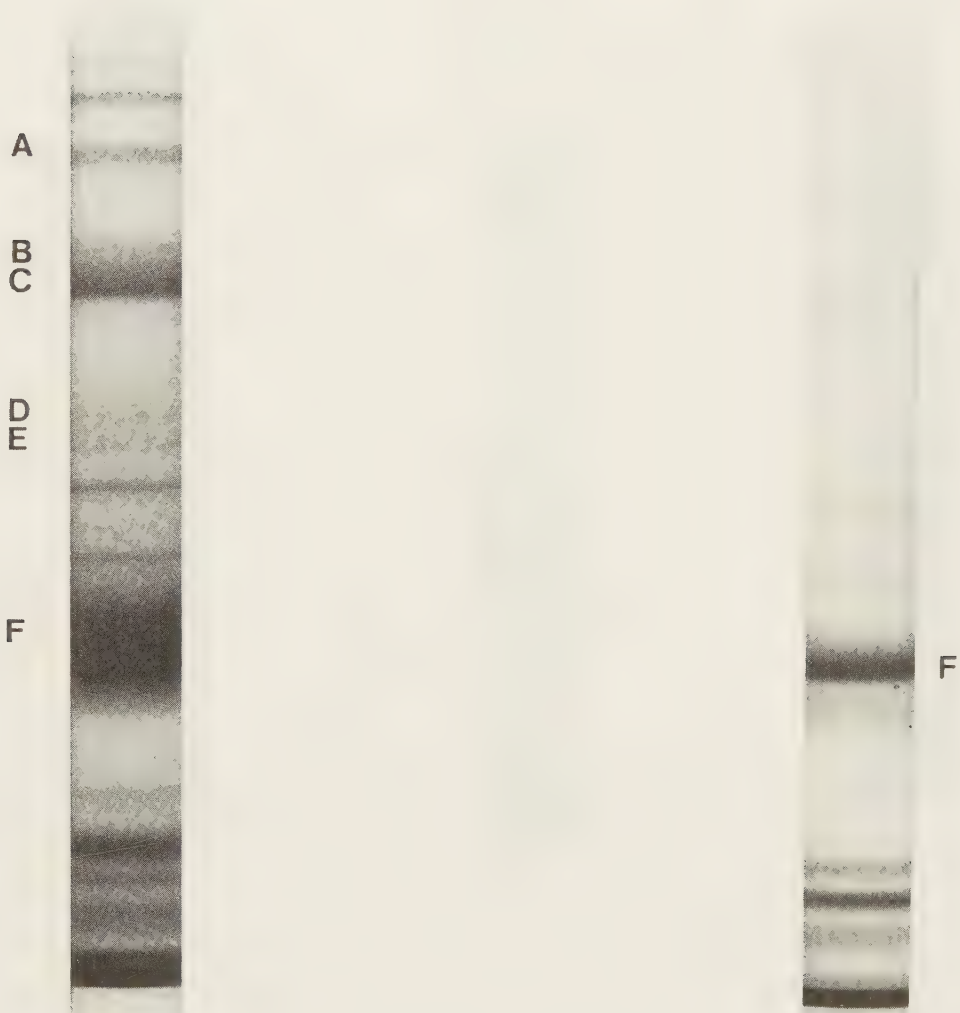


Fig. 33. Séparation des protéines pelliculaires en une phase soluble (voir II.5.) et une phase insoluble dans l'acide acétique 0,1 N. Les gels SDS ont 7,5 % de polyacrylamide. Méthode II.4.1.

Les protéines des bandes D et E sont proportionnellement plus abondantes dans les gels des bouches que dans ceux des pellicules. Ceci est apparent dans les tracés densitométriques de ces gels. Ce résultat suggère une accumulation préférentielle de ces protéines dans les structures buccales.

- c) les protéines A, B et C sont absentes des bouches isolées et se situent donc principalement dans le cortex somatique. Elles ne peuvent être localisées avec précision. Les tests de solubilisation montrent une corrélation entre la disparition du cinétodesme et l'extraction des bandes A et C. Une partie de l'épiplasme semble également être extraite par la haute force ionique (II.5.), ce qui est suggéré par l'aspect "en treillis" des pellicules traitées (fig. 7 de l'annexe 2).

A partir de ces données, plusieurs hypothèses sont possibles :

- 1) A € cinétodesme (€ : appartient à)
 B + C € épипlasme
- 2) C € cinétodesme
 A + B € épипlasme
- 3) A + C € cinétodesme
 B € épипlasme
- 4) A + B + C € épипlasme

kd n'a pas de protéine majeure

- d) Les pellicules purifiées furent également solubilisées par l'acide phosphotungstique neutralisé (abr. PTA), selon les indications de Rubin et Cunningham (15). Les structures restées insolubles dans 1 % ou 0,1 % PTA furent examinées au M.E. par la méthode d'adhésion (II.7.1.). Aucune différence significative ne fut remarquée dans la composition des fractions insolubles, aux deux concentrations de PTA. Les électrophorèses sur gel SDS ont révélé des anomalies dans la migration de certaines protéines. Les anomalies sont constatées même après la technique de dialyse des échantillons recommandée par Rubin et Cunningham (15). La coloration de certaines bandes diminue, celle d'autres bandes augmente (voir exemple dans fig. 34). La technique de solubilisation par le PTA n'a pas contribué à localiser A, B et C dans des structures corticales définies.

L'ensemble des informations données par les tests de solubilisation est récapitulé dans la table 5.

TABLE 5

Récapitulation des tests de solubilisation

Protéines		structure corticale
F1, F2	—————→	microtubules
D et(ou) E	—————→	microfilaments et plaque terminales
B(A?, C?)	—————→	épiplasme
A?, C?	—————→	cinétodesme

IV.5. DISCUSSION

Les observations ultrastructurales des bouches purifiées peuvent être comparées à celles de Wolfe (20), l'auteur de la méthode reprise ici. Il constate l'absence de membranes et de ribs. Il observe également la longueur limitée du microtubule C dans les cinétosomes. Les techniques d'observation qu'il emploie (méthode d'adhésion et coloration négative) offrent le risque, mal connu, de solubiliser sélectivement certaines structures. Les coupes ultra-fines des bouches fixées, effectuées dans le présent travail, permettent de constater d'une manière plus sûre l'absence de membrane. Elles montrent aussi, d'une manière plus claire que précédemment l'étroite connexion des plaques terminales et des micro-filaments (fig. 17, 18).

Les observations ultrastructurales des pellicules purifiées ne sont pas directement comparables à celles d'autres auteurs, la méthode de purification employée ici étant originale. Nozawa et Thompson (22) montrent des pellicules ayant conservé l'ensemble de leurs membranes et leurs mucocystes. Hartmann et coll. (24) décrivent les pellicules qu'ils ont purifiées comme étant privées partiellement de membranes. Leur description résumée n'est pas assez détaillée pour être comparée à celle donnée ici. Les pellicules purifiées par la technique II.3.3. semblent privées de toute composante membranaire. Les observations au M.E. ne peuvent cependant exclure la présence de fragments de P3 (membrane interne) collés à l'épiplasme. Ces fragments ne sont pas détectables si la structure caractéristique d'une membrane (comprenant trois couches différemment colorées) se trouve détruite par le milieu d'isolement (II.3.3.). De toute façon, ils ne peuvent représenter qu'une faible proportion de l'ensemble membranaire.

La caractéristique majeure des pellicules isolées est leur grande stabilité, inattendue pour des ensembles structuraux à la fois très minces (15-30 nm pour l'épiplasme) et très étendues (plus de $600 \mu^2$). Cette stabilité ne peut s'expliquer que par la solidité structurelle de l'épiplasme. Cette solidité est peut-être renforcée par les liaisons qui s'établissent entre la pointe de chaque fibre

infraciliaire et l'épithélium. Ces liaisons, déjà suggérées par Allen (6) ont souvent été observées sur les pellicules isolées. Ces dernières sont donc un matériel de choix pour étudier comment chaque structure agit pour stabiliser l'ensemble cortical. Les techniques de purification des bouches et des pellicules originales (II.3.3.) ou perfectionnées (II.3.2.) facilitent l'investigation des protéines corticales. Elles sont à la fois simples et rapides. Elles n'impliquent pas de traitement par des agents mécaniques, qui sont souvent difficiles à reproduire d'un laboratoire à l'autre. La grande réduction des composantes membranaires simplifie l'analyse des autres protéines structurales. La comparaison de pellicules sans membrane (II.3.3.) et de pellicules avec membranes (ex. 22) permettrait de mettre aussi en évidence les principales composantes protéiques des membranes corticales.

L'identification de protéines corticales (celles des bandes A à F) s'est révélée assez simple. Les protéines des bandes A à E qui sont abondantes dans les bouches et les pellicules ne sont pas décelables dans les autres structures sub-cellulaires. Seule la présence de D et E ne peut être exclue des noyaux (contaminés par les bouches). Cependant, il est peu vraisemblable que les protéines des bandes D et E, en quantité mineure dans les fractions riches en noyaux, en quantité majeure dans les fractions très pauvres en noyaux (bouches isolées) soient des protéines nucléaires.

Les protéines de la bande F sont les seules protéines répandues dans plusieurs fractions subcellulaires. Heureusement, leur identification est facilitée par les travaux de nombreux auteurs qui ont démontré l'extraordinaire stabilité physico-chimique des tubulines dans le règne vivant. Des observations plus spécifiques sur les tubulines ciliaires et buccales de *Tetrahymena* ont confirmé qu'elles ne font pas exception : les protéines de la bande F ont toutes les caractéristiques des tubulines.

Les déterminations de PM dans le système SDS ont donné des résultats précis et constants pour les protéines des bandes D et E. Les valeurs similaires de PM, obtenues à deux concentrations de polyacrylamide indiquent un comportement normal de ces protéines dans le système SDS.

Les valeurs différentes des PM de F1 et F2 à deux concentrations de polyacrylamide peuvent s'expliquer par plusieurs facteurs :

- 1) la relation entre le log PM et la mobilité relative n'est peut-être pas linéaire. La droite de régression donne des valeurs de PM plus élevées qu'une hyperbole passant plus près des points (fig. 30), surtout au niveau de F1 et F2.
- 2) F1 et F2 sont en quantité importante dans les gels 7,5 % et 10 %. Cela produit peut-être un léger déplacement de leur mobilité relative par rapport à celles de protéines diluées.
- 3) Les protéines des bandes F ont peut-être un comportement légèrement anormal dans le système SDS.

Quels que soient la réalité et le poids de ces facteurs, le PM de F1 et F2 peut être estimé comme plus proche de 50000 que de 60000.

Les PM des protéines dans les bandes A, B et C n'ont pas pu être comparés à ceux de protéines de référence dénaturées et réduites, qui ont fait défaut. La comparaison avec la courbe des polymères de l'ovalbumine n'a qu'une valeur indicative, car le comportement des polypeptides non réduits est encore mal connu dans le système SDS. Griffith indique cependant que des polymères artificiels de l'ovalbumine, produits par traitement à la glutaraldéhyde, ont la même mobilité relative sous forme réduite ou non réduite (36). La présence dominante de chaînes d'acides aminés de haut PM est vraiment une caractéristique des pellicules isolées par la méthode II.3.3. La fig. 28 montre que toutes les protéines majeures ont un PM supérieur à 40000. Cette situation est inversée dans les fractions riches en mitochondries, microsomes et noyaux, composés en majorité de chaînes d'acides aminés de PM inférieur à 40000 (fig. 27). Dans le cas des protéines corticales, on ne peut exclure que les chaînes d'acides aminés soient interrompues par

d'autres résidus (p. ex. des sucres) qui assureraient la liaison entre de plus petites chaînes d'acides aminés.

L'absence de ponts disulfures existant entre différentes protéines des bandes majeures A à F facilite la solubilisation de la plupart des structures corticales dans l'acide acétique dilué. Les tubulines sont peu solubles dans ce milieu, dont le pH est trop proche de leur point isoélectrique. Elles sont par contre solubles à pH 8 par la haute force ionique. La présence de ponts disulfures, longtemps controversée pour les tubulines, semble due à une oxydation, se produisant après la solubilisation des protéines (37). La formation de ponts S-S peut aussi survenir pendant l'électrophorèse dans de l'urée 8 M. Différents auteurs (ex. 37, 38) l'ont évitée en alkylant la protéine réduite.

La méthode de solubilisation sélective, utilisée pour tenter de localiser les protéines corticales avec précision, comporte plusieurs difficultés :

- a) le contrôle cytologique au M.E. (II.7.1.) peut indiquer l'absence d'une structure définie. Cette absence ne signifie pas forcément que la structure soit devenue soluble. Elle peut s'être transformée en un objet non identifiable qui sédimente à 15000 g (II.5.).
- b) le contrôle cytologique (II.7.1.) peut indiquer la persistance d'une structure donnée (p. ex. les cinétodesmes). La présence de cinétodesmes n'indique pas quelle proportion d'entre eux sont restés intacts.
- c) les structures fixées, après le test de solubilisation, et concentrées en un culot, pour l'inclusion et la microtomie, forment un enchevêtrement rendant difficile l'interprétation de coupes ultrafines. Ce phénomène est surtout important dans le cas de pellicules et de bouches isolées.
- d) le nombre de bouches et surtout de pellicules isolées dans une suspension est difficile à estimer, car ces ensembles forment facilement des agrégats.

Les résultats de la table 5 doivent donc être lus en tenant compte de ces difficultés.

Les résultats de solubilisation sélective de ce travail peuvent être comparés à ceux de Rannestad et Williams (21). Ces auteurs ont d'abord montré que la haute force ionique extrait sélectivement les tubulines des bouches. Les résultats de cette solubilisation, analysés ici sur gel SDS, complètent les données de ces auteurs (21) obtenues sur gel urée en milieu alcalin. Récemment, Williams (39) a montré un gel urée de protéines buccales sur lequel apparaît une autre bande majeure, de faible mobilité relative, à côté de la double bande des tubulines. Wolfe (40) décrit aussi une bande majeure de faible mobilité, parmi les protéines buccales isolées selon sa méthode. Il localise cette composante non microtubulaire dans les "microfilaments" de la bouche : il appelle microfilaments tout ce qui reste dans la bouche extraite à la haute force ionique. Ceci veut dire qu'il ne tient aucun compte des différences morphologiques existant entre les réseaux de microfilaments et les plaques terminales. Il est possible que la bande majeure de faible mobilité, montrée par Williams (39) et Wolfe (40) corresponde aux protéines se trouvant dans les bandes D et E de nos gels SDS.

L'analyse des protéines corticales majeures de *Tetrahymena* peut être comparée à celle des protéines épiplasmiques de *Pseudomicrothorax dubius* (41). Les protéines de l'épiplasme isolé de *P. dubius* sont groupées en un petit nombre de bandes majeures, sur gel SDS :

- a) 3 bandes comprennent des protéines d'un PM voisin de 12000.
- b) une bande très importante comprend des protéines d'un PM de 78000-80000.

Aucune de ces bandes épiplasmiques de *P. dubius* ne correspond à celles de la pellicule de *T. pyriformis*, les PM des protéines étant différents. L'épiplasme, qui présente des différences.

morphologiques chez les deux Ciliés, présente donc aussi des différences moléculaires.

Les résultats de Rubin et Cunningham (15), attribuant un PM déterminé à des protéines de cinétosomes et de cinétodesmes, ne concordent pas bien avec ceux de ce travail. La comparaison est d'autant plus difficile que ces auteurs (15) ont purifié les organelles dans des conditions très différentes des nôtres. Le moyen d'identification qu'ils emploient est le test de solubilisation sélective des protéines corticales par le PTA 1 % et 0,1 %. Les expériences présentées ici montrent les dangers qu'offrent ce type de test et les artefacts que produit le PTA dans la séparation des protéines sur gel SDS. Le point le plus divergent entre ce travail et celui de Rubin et Cunningham concerne la protéine du cinétodesme. Ces deux auteurs l'identifient à un "peptide unique de PM 21000". Les gels SDS de l'ensemble des protéines corticales (fig. 28) présentés ici ne montrent aucune bande majeure dans cette zone de PM, malgré la présence de nombreux cinétodesmes dans les pellicules isolées.

DISCUSSION GENERALE

La première étape de ce travail a eu comme but la purification de structures corticales. La seconde étape a cherché à séparer et identifier des protéines corticales à partir de structures purifiées : les bouches et les pellicules. L'analyse protéique s'est révélée assez simple, car les techniques générales de séparation des protéines ont pu être utilisées sans modification. Par contre, la première étape se révéla très difficile, car aucune technique courante de séparation d'organelles ne permit de prévoir quelles seraient les meilleures conditions de purification corticale.

Un grand nombre d'essais de fragmentation cellulaire et pelliculaire ont mis en lumière les facteurs intrinsèques à la pellicule, qui s'opposent à la purification efficace de structures corticales individuelles :

- a) la zone de jonction entre le cinétosome et l'épiplasma, au niveau de la plaque terminale est extrêmement solide. Elle ne se laisse ni casser, ni solubiliser facilement. Si elle casse néanmoins, le cinétosome isolé devient très fragile et se désintègre rapidement.
- b) la zone de jonction entre le cinétosome et le cinétodesme est renforcée par des structures annexes, denses aux électrons (6). Cette zone de jonction est difficile à casser. Le plus souvent, elle reste attachée soit au cinétosome, soit au cinétodesme. Cela peut indiquer que le complexe cinétosome-cinétodesme n'est dissocié qu'avec la rupture d'un des constituants.

La résistance de ces deux zones de jonctions corticales, qui est mise en évidence par nos expériences de désintégration et celles d'autres investigateurs (12, 14, 15) a peut-être un rôle physiologique essentiel : celui de permettre à la zone corticale de résister aux tensions exercées sur elle par le mouvement ciliaire.

D'autres expériences ont mis en évidence la résistance de l'ensemble de la pellicule, sous certaines conditions, à plusieurs agents de dissociation. Cette résistance correspond à une stabilisation brutale de la zone corticale, qui a perdu son élasticité habituelle. Cette réaction de stabilisation semble provoquée par une baisse du taux

de Ca^{2+} dans le milieu d'isolement. Les pellicules isolées et purifiées par la méthode II.3.3. restent stabilisées en l'absence de membranes. L'épiplasme joue un rôle essentiel dans la stabilité de ces pellicules.

Comme les purifications de structures corticales individuelles se révélaient très ardues, il a fallu effectuer l'investigation des protéines corticales à partir des bouches et des pellicules purifiées, qui sont des ensembles structuraux beaucoup plus complexes. Les techniques de purification buccale et pelliculaire ont eu l'avantage d'éliminer de l'analyse protéique les composantes membranaires. Grâce à cette élimination, les principales protéines corticales non-membranaires peuvent être identifiées, en fonction de leur poids moléculaire. Quatre groupes protéiques de PM très différents renferment six bandes électrophorétiques. Chaque bande contient un nombre indéterminé de protéines différant par la charge, mais homogènes par le PM. La bande F fait exception à cette règle, car elle contient deux sous-bandes de PM différent.

Les deux sous-bandes de F peuvent être considérées comme faisant partie du même groupe protéique : les tubulines, qui ont un PM d'environ 110000. Les protéines de chaque sous-bande de la tubuline semblent réparties d'une façon équimolaire dans chaque microtubule (42). Le nombre de protéines dans chaque sous-bande F1 et F2 n'est encore déterminé d'une façon définitive, ni dans *Tetrahymena*, ni dans d'autres organismes (ex. 43,44).

Les protéines corticales des bandes A à E semblent présentes seulement dans le cortex. Leur localisation précise est encore mal connue. Les tests de solubilisation sélective indiquent que D et E sont présents surtout dans la région buccale, vraisemblablement au niveau des microfilaments et (ou) des plaques terminales. Les protéines A, B et C sont au contraire situées dans le cortex somatique. Ensemble, elles pourraient constituer tout ou partie de l'épiplasme et des cinétodesmes. Individuellement, les protéines de chaque bande ne sont pas localisables par les tests de solubilisation.

La présence de quelques groupes protéiques en quantité dominante dans le cortex a une signification morphogénétique importante. Elle permet de supposer que non seulement les microtubules, mais d'autres structures sont composées de blocs protéiques homogènes juxtaposés. Une telle homogénéité est assez fréquente dans des fibres périodiques, des microfilaments et des parois de virus ayant une forme géométrique simple (45). Les cinétodesmes et les microfilaments de *Tetrahymena* présentent peut-être une telle homogénéité au niveau moléculaire. Le passage de l'investigation protéique, décrite dans ce travail, à une approche moléculaire des phénomènes morphogénétiques nécessite encore une étape intermédiaire : la localisation des protéines de chaque bande électrophorétique dans une structure corticale précise. Deux méthodes peuvent contribuer à cette identification :

- 1) le réassemblage spontané de structures, identifiables au M.E., à partir de leurs composantes protéiques solubilisées.
- 2) l'identification immunologique par des anticorps anti-A, anti-B, etc. (A, B, ... : ensemble des protéines de la bande A, B, ...).

Ces deux techniques nécessitent la purification préalable des protéines de la bande A, B, etc. Le programme de séparation préparative des protéines corticales de chaque bande est actuellement en cours. Le succès des chromatographies sur gel et autres méthodes de fractionnement va dépendre surtout d'une solubilisation homogène des protéines corticales.

L'assemblage en éprouvette dépend des capacités d'auto-assemblage inhérentes à chaque structure. Il dépend également du choix d'un milieu chimique approprié. Le succès d'une telle approche est donc imprévisible.

La méthode immunologique, bien que nécessitant des manipulations plus complexes, offre une plus grande chance d'identification que l'assemblage en éprouvette. Les anticorps anti-A, anti-B, ... qui ont réagi avec des structures corticales peuvent être mises en évidence au M.E. par réaction avec un sérum antigammaglobuline, couplé à un marqueur enzymatique. Le succès de l'identification immunologique est conditionné par la production de bons anticorps anti-A, anti-B, etc.

Deux sortes d'études sont réalisables une fois localisées les protéines des bandes A à E dans le cortex :

- 1) certains mécanismes morphogénétiques peuvent être mis en évidence en étudiant l'incorporation et la stabilité des protéines dans les structures corticales. L'évolution des protéines dans les structures peut être suivie à l'aide d'un marquage radioactif approprié. Une telle approche a déjà été réalisée par Rannestad & Williams (21) et Williams & Nelsen (46) pour les protéines buccales de *Tetrahymena*.
- 2) certains mutants de *Tetrahymena* présentent des anomalies corticales. Si ces anomalies n'empêchent pas l'isolement et la purification des pellicules, les protéines des cellules mutantes peuvent être comparées à celles de cellules normales. Si une anomalie moléculaire est décelable, on peut rechercher à quel niveau sub-cellulaire cette anomalie agit et mettre ainsi en évidence un mécanisme de contrôle morphogénétique.

Le succès de cette dernière approche est imprévisible et dépend de la nature des mutations produites. L'analyse moléculaire d'anomalies morphogénétiques représente néanmoins une des rares voies pouvant mener à la compréhension détaillée de la morphogénèse corticale d'un Cilié.

REFERENCES

1. WILLIAMS N.E. et FRANKEL J. 1973. Cortical development in Tetrahymena.
Dans "Biology of Tetrahymena", p.375.
Edit. A.M. Elliot. Dowden, Hutchinson & Ross, Inc.
2. WILLIAMS N.E. Sous presse. Regulation of microtubules.
Int. Rev. Cytol.
3. NANNEY D.L. 1972. Cytogeometric integration in the ciliate cortex.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 193,14.
4. GRAIN J. 1969. Le cinétosome et ses dérivés chez les Ciliés.
Ann. Biol. 8,53.
5. PITELKA D.R. 1965. New observations on cortical ultrastructure in
Paramecium.
J. Microsc. 4,373.
6. ALLEN R.D. 1967. Fine structure, reconstruction and possible functions
of components of the cortex of Tetrahymena pyriformis.
J. Protozool. 14,553.
7. ALLEN R.D. 1969. The morphogenesis of basal bodies and accessory struc-
tures of the cortex of the ciliated protozoan Tetrahymena pyriformis.
J. Cell Biol. 40,716.
8. HANSON E.D. 1967. Protozoan development. Dans "Chemical zoology" I.
Protozoa, p.395. Edit. Florkin et Kidder. Academic Press.
9. BEISSON J. 1972. Déterminants nucléaires et cytoplasmiques dans la
biogénèse des structures chez les Protozoaires.
Ann. Biol. 11,401.
10. FRANKEL J. Sous presse. Positional information in unicellular organisms.
J. Theor. Biol.
11. SEAMAN G.R. 1960. Large scale isolation of kinetosomes from the ciliated
protozoan Tetrahymena pyriformis.
Exp. Cell Res. 21,292.

12. ARGETSINGER J. 1965. The isolation of ciliary basal bodies (kinetosomes) from Tetrahymena pyriformis.
J. Cell Biol. 24,154.
13. HOFFMAN E.J. 1965. The nucleic acids of basal bodies isolated from Tetrahymena pyriformis.
J. Cell Biol. 25,217.
14. SATIR B. et ROSENBAUM J.L. 1965. The isolation and identification of kinetosome-rich fractions from Tetrahymena pyriformis.
J. Protozool. 12,397.
15. RUBIN R.W. et CUNNINGHAM W.P. 1973. Partial purification of basal bodies and kinetodesmal fibers from Tetrahymena pyriformis.
J. Cell Biol. 57,601.
16. CHILD F.M. et MAZIA D. 1956. A method for the isolation of the parts of Ciliates.
Experientia 12,161.
17. WILLIAMS N.E. et ZEUTHEN E. 1966. The development of oral fibers in relation to oral morphogenesis and induced division synchrony in Tetrahymena.
C.R. Trav. Lab. Carlsberg 35,101.
18. WHITSON G.L., PADILLA G.M., CANNING R.E., CAMERON I.L., ANDERSON N.G. et ELROD L.H. 1966. The isolation of oral structures from Tetrahymena pyriformis by low-speed zonal centrifugation.
Nat. Cancer Inst. Monogr. 21,317.
19. FORER A., NILSSON J.R. et ZEUTHEN E. 1970. Studies on the oral apparatus of Tetrahymena pyriformis GL.
C.R. Trav. Lab. Carlsberg 38,67.
20. WOLFE J. 1970. Structural analysis of basal bodies of the isolated oral apparatus of Tetrahymena pyriformis.
J. Cell Sci. 6,679.
21. RANNESTAD J. et WILLIAMS N.E. 1971. The synthesis of microtubule and other proteins of the oral apparatus in Tetrahymena pyriformis.
J. Cell Biol. 50,709.

22. NOZAWA Y. et THOMPSON G. 1971. Studies of membrane formation in Tetrahymena pyriformis. II. Isolation and lipid analysis of cell fractions.
J. Cell Biol. 49,712.
23. FLAVELL R.A. et JONES I.G. 1971. DNA from isolated pellicles of Tetrahymena.
J. Cell Sci. 9,719.
24. HARTMANN H., MOSS P. et GURNEY T. 1972. Tetrahymena pellicles isolated in EDTA and Tween 80.
J. Cell Biol. 55,107 a.
25. SONNEBORN T.M. Sous presse. Ciliate morphogenesis and its bearing on general cellular morphogenesis.
Progress in Protozoology.
26. NILSSON J.R. et WILLIAMS N.E. 1966. An electron microscope study of the oral apparatus of Tetrahymena pyriformis.
C.R. Trav. Lab. Carlsberg 35,119.
27. DE HALLER G. 1969. Interactions nucléocytoplasmiques dans la morphogénèse des Ciliés.
Ann. Biol. 8,115.
28. ROSENBAUM J.L. et CARLSON K. 1969. Cilia regeneration in Tetrahymena and its inhibition by colchicine.
J. Cell Biol. 40,415.
29. BOLLINGER J.A. 1971. DNA synthesis by isolated nuclei and mitochondria of Tetrahymena pyriformis.
Thèse Univ. California, Berkeley, Californie.
30. LAEMMLI U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4.
Nature 227,680.
31. SHAPIRO A.L., VINUELA E. et MAIZEL J.V. 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 28,815.

32. GIBBONS I.R. 1963. Studies on the protein components of cilia from Tetrahymena pyriformis.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 50,1002.
33. REYNOLDS J.A. et TANFORD C. 1970. The gross conformation of protein-sodium dodecylsulfate complexes.
J. Biol. Chem. 245,5161.
34. DUNKER A.K. et RUECKERT R.R. 1969. Observations on molecular weight determinations on polyacrylamide gel.
J. Biol. Chem. 244,5074.
35. WEBER K. et OSBORN M. 1969. The reliability of molecular weight determinations on polyacrylamide gel electrophoresis.
J. Biol. Chem. 244,4406.
36. GRIFFITH I.P. 1972. The effects of cross-links on the mobility of proteins in dodecylsulfate-polyacrylamide gels.
Biochem. J. 126,561.
37. RENAUD F.L., ROWE A.J. et GIBBONS I.R. 1967. Some properties of the protein forming the outer fibers of cilia.
J. Cell Biol. 36,79.
38. SHELANSKI M.L. et TAYLOR E.W. 1968. Properties of the central pair and outer doublet microtubules of sea urchin flagella.
J. Cell Biol. 38,304.
39. WILLIAMS N.E. Communication personnelle.
Congrès international de protozoologie. Clermont-Ferrand. 1973.
40. WOLFE J. 1972. Basal body fine structure and chemistry.
Dans "Advances in cell and molecular biology". p.151. Edit. E.J. DuPraw. Academic Press.
41. PECK R.E. Communication personnelle.
42. BRYAN J. 1972. Vinblastine and microtubules. II. Characterization of two protein subunits from the isolated crystals.
J. Mol. Biol. 66,157.
43. WITMAN G.B., CARLSON K. et ROSENBAUM J.L. 1972. Chlamydomonas flagella. II. The distribution of tubulins 1 and 2 in the outer doublet microtubules.
J. Cell Biol. 54,540.

44. FEIT H., SLUSAREK L. et SHELANSKI M.L. 1971. Heterogeneity of tubulin subunits.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 68,2028.
45. KUSHNER D.J. 1969. Self-assembly of biological structures.
Bacteriol. Rev. 33,302.
46. WILLIAMS N.E. et NELSEN E.M. 1973. Regulation of microtubules in Tetrahymena. II. Relation between turnover of microtubule proteins and microtubule dissociation and assembly during oral replacement.
J. Cell Biol. 56,458.

ANNEXE 1ACTION DE L'EDTA SUR TETRAHYMENA

Tetrahymena présente une réaction caractéristique à l'EDTA, lorsqu'il est soumis à différents agents lytiques :

- 1) si les cellules sont placées dans différents milieux de très haute pression osmotique (saccharose 1 M dans 10 mM tampon Imidazole-HCl, pH 6,8), elles présentent une évolution en trois phases : rétrécissement, regonflement, lyse. Chaque phase peut être modifiée en ajoutant au milieu saccharose-Imidazole d'autres substances chimiques. Les changements les plus importants sont obtenus par l'addition de l'EDTA 1 mM. Dans ce cas, les cellules sont protégées, dans leur mobilité et leur intégrité, beaucoup plus longtemps que dans les autres milieux testés. Dans ces derniers, les cellules deviennent sphériques après le regonflement et sont bien lysées après 5 h. à 20° C. En présence d'EDTA, elles conservent une forme allongée, plus proche de leur forme initiale, et sont peu lysées.
- 2) si les cellules sont lysées par 0,5 % de Triton X-100, elles se désintègrent très rapidement dans un milieu contenant 0,25 M de saccharose (dans 10 mM Tampon Imidazole-HCl, pH 6,8). Si l'on ajoute d'autres substances chimiques à ce milieu de base, on obtient des modifications de la lyse. Les substances les plus actives sont l'EDTA et l'EGTA 1 mM. Dans ce cas seulement, certaines cellules ne lysent que partiellement, tandis que d'autres lysent complètement, mais sans dégrader leur zone corticale en petits fragments. L'omission du saccharose ou de l'Imidazole-HCl dans le milieu de lyse ne modifie pas sensiblement l'action de l'EDTA (ou de l'EGTA) sur les cellules et les pellicules.

Les milieux de lyse contenant simultanément du Ca^{++} ou du Mg^{++} plus de l'EDTA, à différents rapports de concentrations donnent les résultats suivants : le Ca^{++} en excès peut renverser l'action de l'EDTA, mais pas le Mg^{++} . On peut donc penser que l'action de l'EDTA (ou de l'EGTA) au niveau des pellicules se fait sur la régulation calcique de la cellule. Une fois

la lyse cellulaire terminée, l'EDTA n'a plus d'action protectrice sur les pellicules isolées et peut être omis des milieux de purification pelliculaire.

Les données obtenues dans ce travail ne permettent pas de savoir où et comment l'EDTA (ou l'EGTA) agit dans la cellule de *Tetrahymena*.

ANNEXE 2

PURIFICATION OF CORTICAL STRUCTURES IN *TETRAHYMENA PYRIFORMIS*

Pierre VAUDAUX

Département de Biologie animale
Université de Genève
Rue de Candolle,
1205 Geneva Switzerland

SUMMARY

Isolated pellicles of the ciliate *Tetrahymena pyriformis* are produced by a new non-alcoholic procedure. Different mechanical or chemical treatments are tested on the pellicles in order to purify some cortical components. Selective solubilization by a non-ionic detergent is a promising system for purification of the basal bodies.

These results show the differential chemical lability of the main cortical structures (membranes, microtubules, etc.). The uneven solubility of the same structures, found either in entire cells or on isolated pellicles is demonstrated and discussed.

RÉSUMÉ

Les pellicules du cilié *Tetrahymena pyriformis* sont isolées dans un milieu non-alcoolique par une nouvelle méthode. Elles sont soumises à différents traitements, mécaniques ou chimiques, en vue d'une purification de certains éléments corticaux. Un procédé de solubilisation sélective par un détergent non-ionique, permet de purifier considérablement les cinétosomes. Par la même occasion, ces traitements révèlent la sensibilité différente de chaque composante du cortex aux mêmes agents chimiques. De plus, la solubilité d'une même structure peut changer fortement, selon qu'elle se trouve dans une cellule entière ou dans une pellicule isolée.

ABBREVIATIONS

am	: alveolar material	im	: interconnecting material
bb	: basal body	pmb	: posterior microtubular band
cr	: circular ring	ps	: parsomal sac
df	: deep fiber	tmb	: transverse microtubular band
fa	: filamentous arrays	tpi	: terminal plate inside the circular ring
kd	: kinetodesmal fiber	tpo	: terminal plate outside the circular ring
lmb	: longitudinal microtubular band		

INTRODUCTION

Direct biochemical approaches for studying morphopoiesis of Ciliates are hindered by the difficulty in isolating the variety of intricate structures (basal bodies, kinetodesmal fibers, microtubular ribbons, membranes, etc.) located in the cellular periphery. This highly differentiated region is usually called the *cortex* or *pellicle*.

In several attempts to get a pure basal body fraction, SEAMAN (1960), ARGETSINGER (1965), HOFFMAN (1965), and SATIR and ROSENBAUM (1965) first separated the entire pellicle from the remnant of the cytoplasm. This preliminary phase was derived from the alcohol-digitalin procedure of CHILD and MAZIA (1956), where the isolated pellicles were stabilized by cold ethanol. But, such stabilization badly compromised the second phase of isolation in which the individual organelles had to be stripped from the pellicles. The best basal body preparations obtained were either contaminated by fibers

(*) Manuscrit reçu le 17 juillet 1972.

and membranes (ARGETSINGER, 1965; SATIR and ROSENBAUM, 1965), or the basal bodies themselves were not left completely intact (SEAMAN, 1960; HOFFMAN, 1965).

Recently, a new method of pellicular isolation in non-alcoholic medium has been devised for *Paramecium* by HUFNAGEL (1969). She also planned to use this medium as a new preliminary phase for purification of individual cortical structures, but no such attempt has yet been reported. The present study is devoted to the development of a second phase of isolation, following a preliminary procedure similar to that used by HUFNAGEL for *Paramecium*. Small adjustments were required for isolating pellicles of *Tetrahymena*. Different mechanical or chemical treatments were utilized in this second phase. One of these methods is very efficient for basal body purification because it allows a selective solubilization of all the contaminating fibers and microtubules usually found in basal body preparations.

The present investigation demonstrates also more precisely than previously reported the main factors which hinder a complete and definitive purification of such labile structures as the cortical organelles and fibers.

MATERIAL AND METHODS

Cultures of *Tetrahymena pyriformis* strain GL were maintained axenically in 50 ml of 1 % Difco proteose peptone (= PP) plus 0.5 % NaCl in 100 ml flasks. Sterile transfers were made weekly. Mass cultures for the preparation of isolated pellicles were done in one liter or two liter flasks containing respectively 0.6 l and 1.2 l of medium PP + NaCl or PP + 0.4 % Difco Yeast extract (= Y). The yield after 4 days of growth was approximately 4×10^4 cells/ml in the PP + NaCl medium, 2×10^5 cells/ml in the PP + Y medium. The cultures were concentrated by centrifugation in a SS-4 Sorvall centrifuge (SS-34 rotor) which was kept in a cold room (2 °C). The average run was at 6000 g for 5 min. The packed cells were resuspended and washed by one or two additional centrifugations in the medium developed by HUFNAGEL (1969) (0.2 M Raffinose in 0.01 M Sodium phosphate buffer pH 6.8) to which 0.001 M EDTA was added. This medium (= H) was then used during the cellular lysis. The concentrated cells in 5 to 10 ml of medium H were transferred to a Tissue 30 ml grinder vessel (Arthur THOMAS Company) having a close-fitting Teflon pestle and were homogenized by hand. The whole cytoplasmic content of the cells was coming out of the surrounding pellicles which remained quite intact. When 95 % of the cells were disrupted, the homogenate was centrifuged at low speed (500 g 6 min) in the medium H in order to sediment the pellicles and to remove most of the non-cortical cytoplasmic contaminants. This last procedure was repeated several times. During each run, the pellicles were resuspended in the medium H by a few pestle strokes of the hand homogenizer.

The repeated differential centrifugations were later replaced by a more efficient technique. In this latter case, the impure pellicular fraction was layered on a discontinuous sucrose density gradient made in 0.01 M sodium phosphate buffer pH 6.8. The gradients were made manually by layering first 2 ml of 28 % sucrose, then 2 ml of 18 % sucrose, then 1 ml of the impure pellicular fraction. The centrifugation was done at 2 000 g during 10 min in the swing-out rotor of a clinical Ecco centrifuge at 2 °C. After the run, the denser cushion (28 % sucrose) and the pellet contained nearly all the pellicles, either whole or in large fragments. Over 90 % of the cytoplasmic contaminants stayed in the intermediary layer 18 % sucrose.

Test of solubilization media on the isolated pellicles.

All procedures, except observations, were carried out at 2 °C. The purified pellicular fraction was divided in several aliquots. Each aliquot was generally submitted to the same solubilizing agent, but in each case, the basic medium (non solubilizing by itself) was modified in its pH or ionic composition (see results). When it was necessary to use a buffer other than phosphate for the tests, the pellicles were washed once or twice in this new buffer, before the solubilizing agent was added. For selective solubilization by detergents, the treatment was brief and the pellicles were washed after a maximum exposure time of 10 min by a centrifugation of 15 000 g for 10 min. Resuspension of the pellet was made in the medium being tested (without detergent) and an additional centrifugation was performed in order to remove most of the detergent. In several media, pellicles were found resistant to strong solubilization and were kept longer than 10 min in the detergent.

Electron microscopy.

Only negative staining was used. 400 mesh copper grids were coated with collodion and carbon. Then the films were made hydrophilic with a glow discharge of 2000 Volts at 10^{-1} - 10^{-2} mmHg pressure (FLEISCHER et al., 1967). A rapidly operating apparatus was built by E. NAGY and is a copy of the one devised by E. BOY DE LA TOUR, Laboratoire de Biophysique, Université de Genève, Geneva, Switzerland. This apparatus is described by DUBOCHET and al. (1) (1971). After the glow discharge, carbon films remained hydrophilic for 24 hours and drops of water-suspended biological samples and stains spreaded very well on the surface. A drop of the sample was applied to the surface of the grid. After 30 sec, the grid was drained, rinsed in H₂O and

(1) See p. 151, used without amylamine atmosphere.

stained with unneutralized 1 % phosphotungstic acid (PTA) for 20 sec, then drained. The preparations were examined with a Hitachi HS-7S electron microscope.

RESULTS

Preparation of isolated pellicles.

The presence of 1 mM EDTA in the raffinose-phosphate medium of Hufnagel was very critical for stabilizing the pellicles and isolating them in large fragments. In such isolations, 50 to 100 hand homogenizer pestle strokes were necessary to rupture 99 % of the cells, which showed considerable rigidity. Phase-contrast observations (fig. 1) of the pellicular fragments thus obtained show a very regular arrangement of the basal bodies and the constant presence of the oral apparatus in each large fragment. It was not possible to break selectively the junction between the somatic region and the oral apparatus, at least by mechanical means; the pellicles must be completely broken down before one could liberate only the oral apparatus. EM observations of the pellicular fragments show the regular disposition and orientation (fig. 2) of the basal bodies (= *bb*), the kinetodesmal (= *kd*), and the transverse and posterior microtubular ribbons (see description in PITELKA, 1961). The longitudinal microtubular ribbons are also present, but are frequently broken (fig. 2).

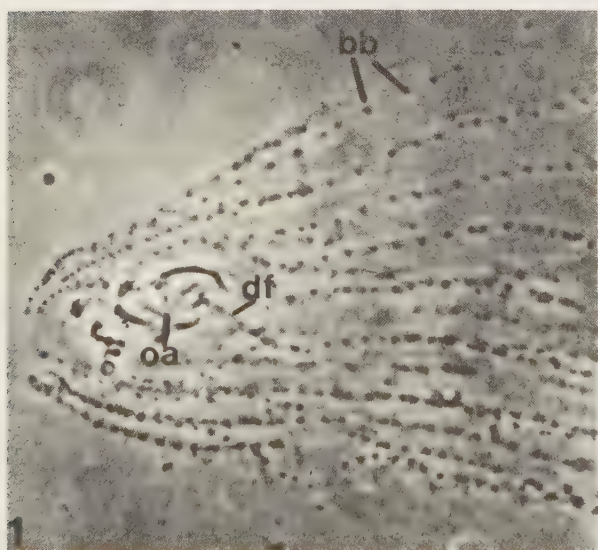


FIG. 1. — A pellicle isolated in raffinose-phosphate-EDTA medium, showing the somatic kineties and their basal bodies (*bb*). The oral apparatus (*oa*) with its deep fiber system (*df*) is apparent. $\times 2000$.

Aside from the large fragments, there were also smaller ones and even free individual basal bodies or *kd* fibers. The latter arose from prematurely broken pellicles. When the raffinose-phosphate medium contained no EDTA, 5 to 10 strokes of the hand homogenizer were sufficient to destabilize the cells, which then underwent rapid cycles of shrinking and expansion leading to a quick rupture of the cell surface. The pellicles were extensively broken (fig. 3). A few more pestle strokes could easily free many individual *kd* fibers from their anchoring basal bodies. Such an easy dissection of the pellicles during the time of cellular lysis was no more observed after the pellicles had been stabilized by EDTA (see next section).

Dissection of isolated pellicles.

a) Mechanical homogenisation.

The assays were done either in 0.2 M Raffinose or 0.25 M sucrose media, in a 0.01 M Sodium phosphate buffer pH 6.8 at 2 °C. Several procedures of variable strength were tried unsuccessfully. Either hand or automated homogenization did not pull apart the individual cortical elements without excessive destruction. These assays revealed that the isolated pellicles were very refractive to mechanical disruptions. Such behaviour was also observed by previous workers (see Introduction) handling pellicles isolated by ethanol and digitonine.

b) Osmotic pressure.

The isolated pellicles were centrifuged and resuspended in a 1.8 M (50 %) sucrose solution in 0.01 M sodium phosphate buffer pH 6.8 at 2 °C. The results were comparable to those of the mechanical procedures. Pellicles were essentially broken into kineties. Most basal bodies were still attached to the membranes.

c) Chemical solubilization.

Triton X-100 was used as a solubilizing agent. All the media finally contained 0.25 M sucrose in different buffer conditions (see below). The influence of pH, salts, chelating or reducing agents on the course of solubilization was tested in different sets of experiments. Table I shows that the extent of the solubilization is very sensitive to pH shifts and less sensitive to the other factors tested.

At pH 6.8 at 2 °C, 0.01 M sodium phosphate buffer, the network pattern of the largest pellicular fragments strongly resisted breakdown into smaller units. When the pellicles were exposed for one hour to 0.04-0.2 % Triton, 10-30 % of these large structures were not desintegrated and still contained their oral apparatus region. This result was not modified by the absence

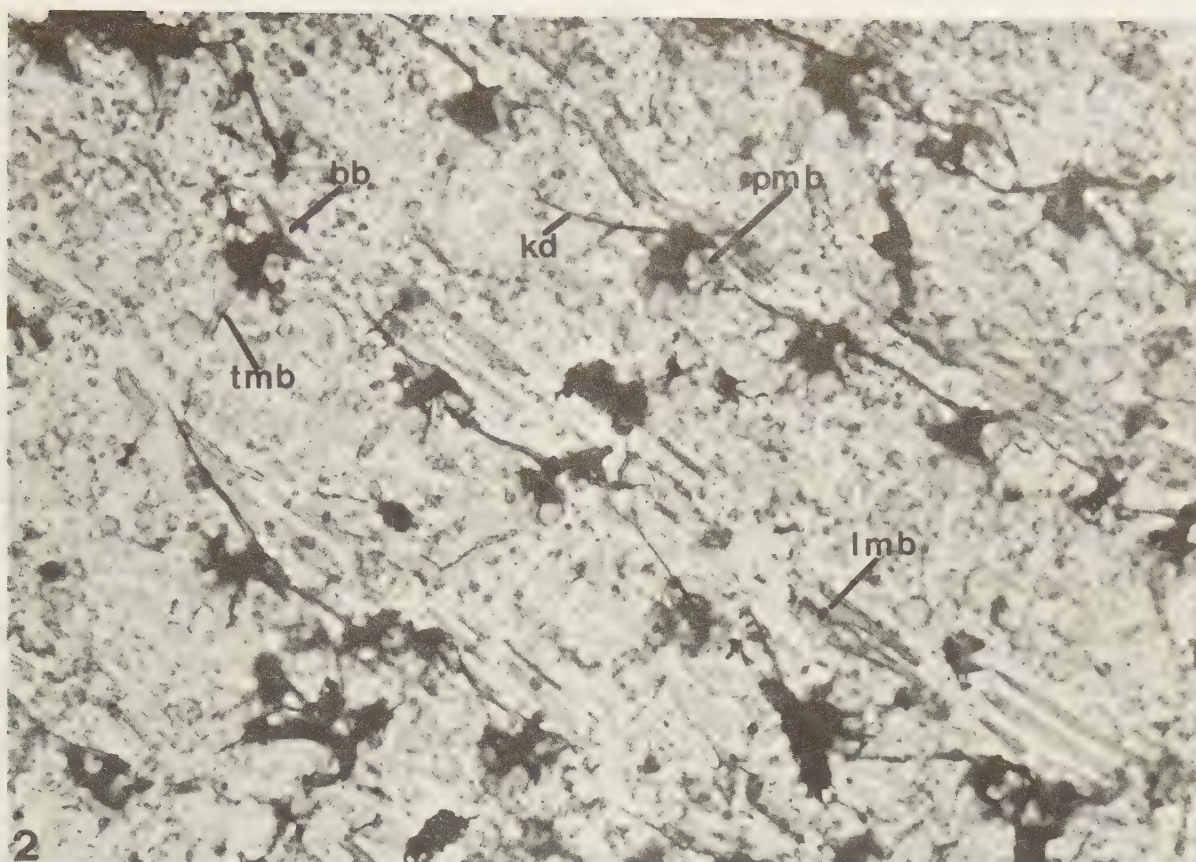


FIG. 2. — A pellicle, isolated in raffinose-phosphate-EDTA medium, is viewed from the inside of the cell. Two microtubular systems are regularly seen associated with the basal body (bb): the transverse microtubular band (tmb) and the posterior microtubular band (pmb). The kinetodesmal system (kd) is obvious. Longitudinal microtubular bands (lmb), found to the right of each kinety, are frequently broken. $\times 12\,000$.

or presence of 0.001 M EDTA. Whereas the basal bodies keep a regular pattern, their surrounding structures become very transparent when observed with phase-contrast microscopy. EM observation of such fragments (fig. 4) does not conclusively reveal which are the unsolubilized elements binding and holding the basal bodies in rather regular arrays. Longitudinal microtubules are extensively broken or absent, as are the posterior and transverse microtubules. The interconnecting material is either membranous or it looks more spongy and is composed of small vesicles.

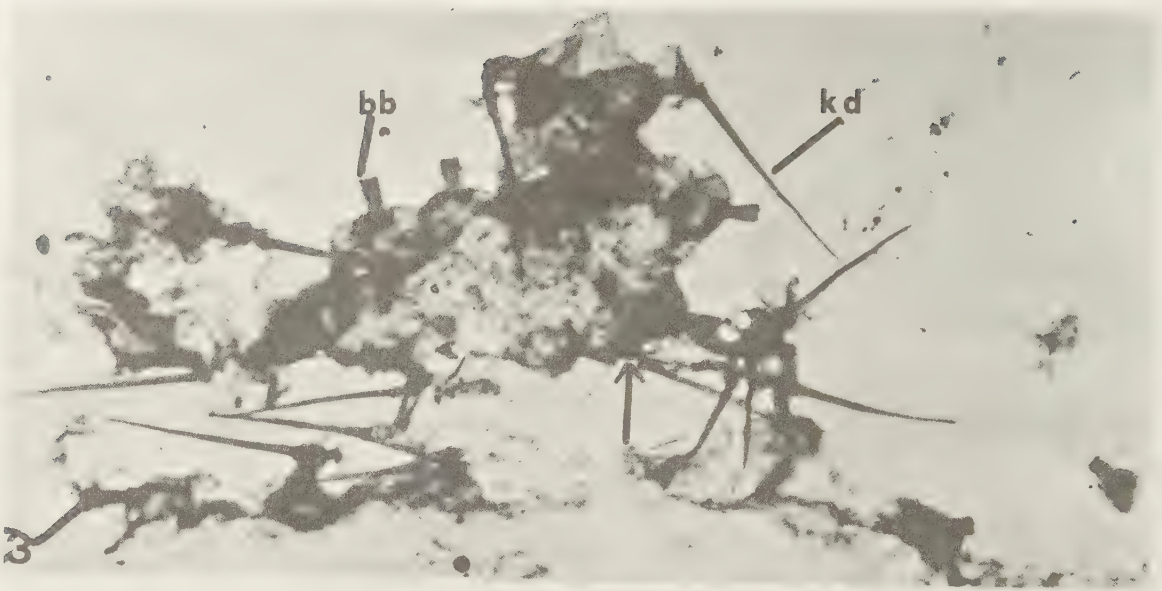
Whether this spongy region results from the degradation of a more compact substance, for example epiplasm, or contains some new material not previously shown in this sections, is presently unknown. Smaller somatic fragments were also encountered. They were either individual kineties, or individual basal bodies or *kd* fibers.

At pH 8.5 at 2 °C, 0.01 M Tris-HCl buffer, all the pellicles broke down into very small fragments within 5 minutes. All the oral apparatuses were freed.

FIG. 3. — A fragment of disordered "pellicle", isolated in a raffinose-phosphate medium. The disposition of the basal bodies (bb) and the kinetodesmal (kd) fibers no longer corresponds to their native pattern. Arrows show the kinetodesmal fibers partially detached from the basal body. $\times 12\,000$.

FIG. 4. — A partially solubilized pellicle, after 1 hr treatment with TRITON X-100 0.04 % at pH 6.9. Only broken parts of the longitudinal microtubular bands (lmb) are present. In this micrograph, but not in all cases, the transverse and posterior microtubular bands have been detached or dissolved. The interconnecting material (im) between kineties is very sparse. $\times 9\,000$.

FIG. 5. — An extensively solubilized pellicle, after short (see Methods and Results) TRITON X-100 treatment at pH 8.3 (Tris-HCl-EDTA). The basal bodies (bb) are in various stages of dissection. Stages 1 and 2 (See text) are present. Epiplasmic and membranous alveolar material (am) has not been completely dissolved in some cases. $\times 12\,000$.



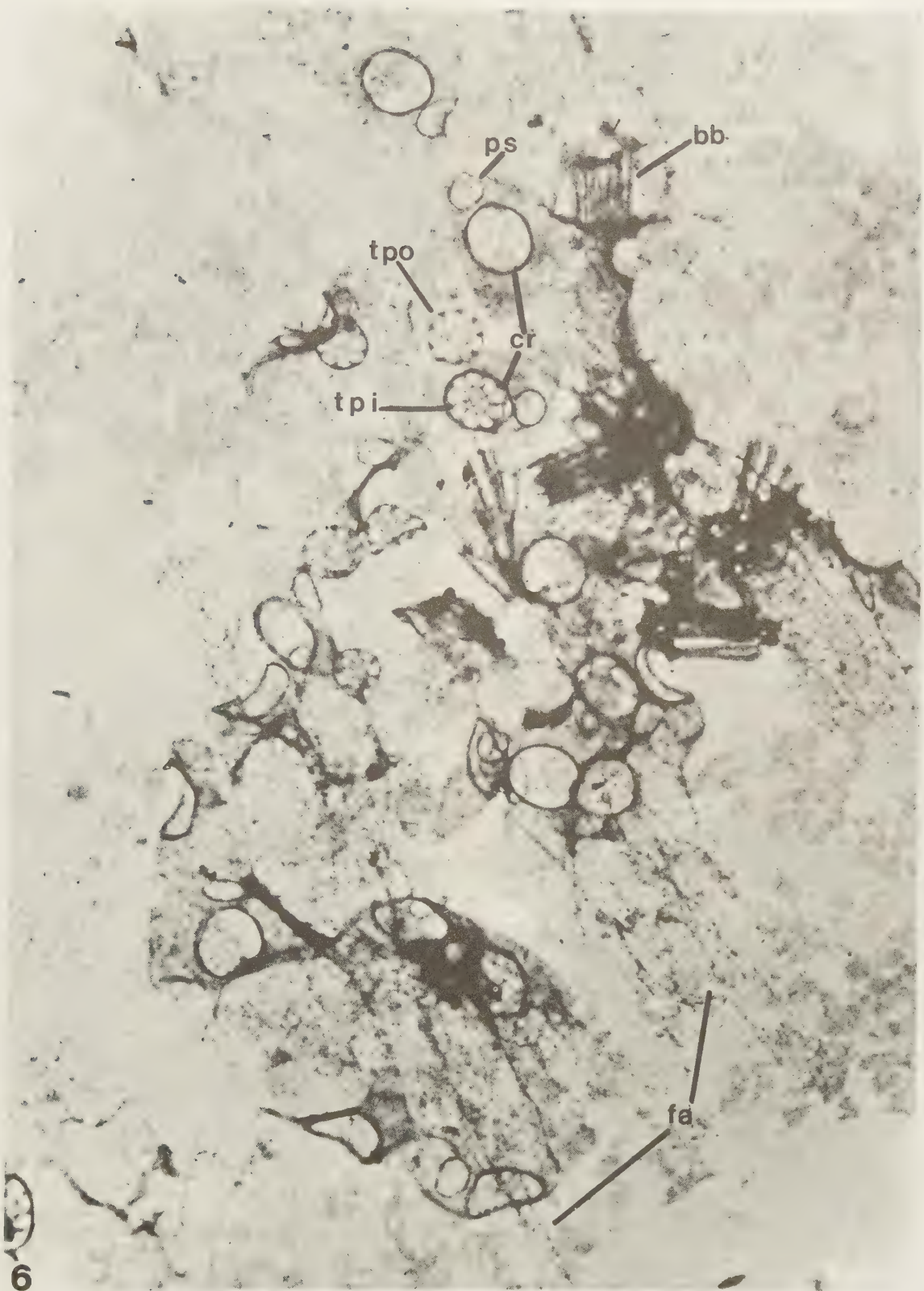


FIG. 6. — Higher magnification of the extensively solubilized pellicle (same fraction as fig. 8). Terminal plates inside (tpi) or outside (tpo) the circular ring (cr) have in most cases lost on this figure their basal body (bb) complement. "Filamentous" arrays (fa) are also evident. $\times 30\,000$.

In *somatic* fragments, the array of *bb* anchoring sites was very irregular (fig. 5, 6) and two adjacent parallel or divergent kinetics could not be recognized. In only a few cases, EM observations revealed that some membranous material was left between two or three *bb*. But, in all other cases, connections between *bb* were thin (filamentous-like, granular-like) or absent. The *kd* fibers and the infracylary microtubular ribbons were scarce (sucrose-Tris) or absent (sucrose-Tris-EDTA medium). They had been completely or partially solubilized in forms which did not sediment (with 10 minutes centrifugation at 15,000 g). The basal bodies were seen either in groups or individually, and they were in different stages of dissection (fig. 5, 6).

Effect of different media on the solubilization of *Tetrahymena* isolated pellicles by Triton X-100 (0.5 %)

TABLE I

pH	Added to the sucrose buffer solution	No of experiments	Fraction of large pellicular fragments remaining unbroken	tot <i>kd</i>	
				tot <i>bb</i>	
6.8	0	3	+++	x	
6.8	EDTA 1mM	2	+++	x	
8.5	0	4	+	x	
8.3	EDTA 1mM	7	+	+	
		2	+	+	
8.5	MgSO ₄ 3mM	2	++	+++	
8.5	Ascorbic acid 0.1 %	2	++	+++	

kd: kinetodesmal fiber.

bb: basal body.

x: undetermined.

+++ : more than 10 %.

++ : between 1 % and 10 %.

+ : less than 1 %.

Stage 1: *Bb* were compact and were heavily stained. Each *organelle* had parallel microtubules and was inserted in the basal ring by means of its terminal plate.

Stage 2: *Bb* were out of the basal ring, but still connected to their terminal plate. In 30-70 % of the cases, their "triplet" microtubules slightly diverged, showing that most internal structures were probably disrupted.

Stage 3: *Bb* had no more terminal plate, their "triplets" were very often diverging or partly missing. No internal structure could be seen.

If we surveyed all *bb*, terminal plates and circular rings, it was difficult to know how many empty basal rings had lost their basal body by breakdown of the organelle and how many by detachment of the intact organelle. Less than 1 % of all *bb* were seen having parallel "triplets" but no terminal plate. This latter structure seemed to be essential for the integrity of the *bb* during isolation.

The terminal plates (fig. 5, 6) were often dislodged from their anchoring site (in the circumciliary ring).

Terminal plates may have been partly solubilized by the detergent, but apparently less than the *bb*.

The circumciliary rings (fig. 5, 6) were more numerous and intact than the basal bodies or the terminal plates. They presented a remarkable resistance to solubilization and a still more striking resistance to distortion. Epiplasm is conspicuous in the region of the circumciliary ring (PITELKA, 1968) and this structure should then be the major component of the isolated rings shown in fig. 5, 6. The oral apparatuses were often partially destroyed. Microtubular components were the most sensitive to solubilization. Basal bodies from the oral apparatus always appeared to be in the process of disintegration when they came out of the membranelles or of the undulating membrane. The general result of oral apparatuses dissection by Triton X-100 in alkaline medium was more heterogeneous than in the somatic region. Unfortunately, the oral apparatuses breakdown products were found difficult to remove from the solubilized somatic fragments (fig. 5, 6), when they were centrifuged together.

Effects of MgSO₄ and ascorbic acid additions in the Tris-HCl-sucrose medium at pH 8.5 (2 °C).

The presence of either 3 mM MgSO₄ or 0.1 % ascorbic acid in the alkaline media markedly influenced the course of the chemical dissection. Indeed these agents protected the pellicle and the oral apparatus from excessive breakdown by Triton X-100. Although the number of entire pellicles or large pellicular fragments was reduced to less than 10 %, the smaller fragments produced were better organized than in Tris-HCl-sucrose medium. The majority of the oral apparatuses were well-preserved. EM observations of the fractions containing Mg²⁺ showed that many *kd* fibers were still present (Table I). But microtubular ribbons were rather scarce and less well preserved. Ascorbic acid also protected the *kd* fibers, but this effect was less constant than with Mg²⁺. Some samples seen with the EM showed well preserved cortical structures, whereas some others appeared completely amorphous. Ascorbic acid enhanced somewhat the aggregation of different cortical structures.

DISCUSSION

Only a portion of the several attempts made in cortical isolation is described in this paper. Nonetheless, it seems at first sight that only one procedure, namely the preparation of isolated pellicles is completely satisfactory in terms of chemical purification. Other purification assays are less successful.

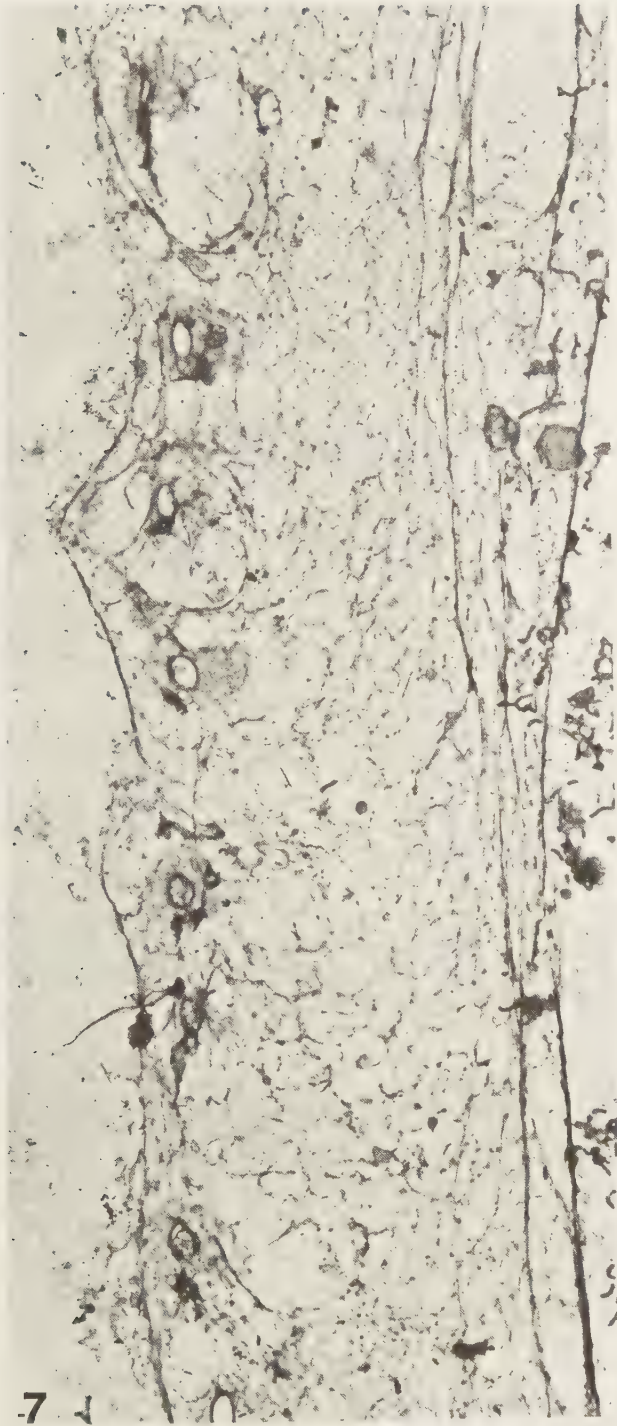


FIG. 7. — Selective solubilization of microtubular and kinetodesmal components of the isolated pellicle by an overnight storage in 0.6 M KCl, 0.1 M Tris-HCl, 0.001 M EDTA pH 6.8 at 2° C. $\times 12\,000$.

But the presentation of these data seems useful for three reasons. First, some chemical work could be initiated. A morphological examination of pellicular fractions, differently solubilized by various procedures could be compared with electrophoretic data of the solubilized or unsolubilized pellicular proteins. The use of several selectively solubilizing agents, namely the detergents (as described here or by GIBBONS 1963), the salts (GIBBONS 1963, WOLFE 1970, RANNESTAD and WILLIAMS 1971), the pH (HUFNAGEL 1969) etc. could well allow the identification of some electrophoretic bands as membranous, epiplasmic or fibrous proteins. Such approaches are being tried in our lab.

Secondly, results of selective solubilization assays made on isolated pellicles indicate the presence of a microscopical "elastic backbone" system, which protects the pellicles from disintegration by mechanical treatments. Such a system is stabilized by EDTA, as seen in the results and in other published preliminary data (VAUDAUX 1971). EM analysis of some pellicular fragments produced in the presence of EDTA, then treated by 0.6 M KCl in Tris-HCl-EDTA buffer pH 8.0 at 2° C (see GIBBONS, 1963), shows in these cases the absence of a regular two dimensionnal microtubular system which could stabilize the pellicular regular pattern. The spongy-like or filamentous-like material shown in the fig. 7 might be a constituent of the "elastic backbone" system. The nature of this material is still enigmatic. But such findings, in addition to the recent evidence of FRANKE (1971), show the necessity to reconsider and perhaps modify the previous assumptions (KENNEDY and ZIMMERMANN, 1970) on the dominant control of microtubular systems in determining shape and elasticity of the tetrahymenine cell.

Thirdly, the purification assays presented here show better than previously reported the main obstacles which must be overcome to obtain very pure fractions of basal bodies. The first obstacle is precisely the "elastic backbone" system just described. Excessive stabilization of this system by EDTA or by ethanol (CHILD and MAZIA, 1956) hinders in many cases a gentle homogenization or a selective solubilization of the isolated pellicles. It is then necessary to use a "destabilizing" medium for performing any good homogenization or selective solubilization of the isolated pellicles. We have found one medium which is "destabilizing" at pH 8.5 and which has been used until now for only solubilization assays. This pH may be critical for the preservation of the entire basal bodies, especially of their central core regions. The second obstacle is still more critical and concerns the strong junction between the epiplasm and the basal bodies. Perfect breakage or solubilization of this bond must be performed for allowing a smooth detachment of the basal bodies from the remnant of the pellicle and for isolating a pure basal body fraction. Achievement of this goal is rather uncertain, because the bond between basal bodies and epiplasm may be stronger than the organelles themselves, which are very labile structures. A similar problem also exists in the oral apparatus, where it is difficult to strip the basal bodies from. These organelles are also more highly integrated by microfilamentous and microtubular arrays (WOLFE,

1970). Our assays and results show that it is much easier to strip the basal bodies from the somatic pelli-
cular region than from the oral apparatus region.

ACKNOWLEDGMENTS

The guidance and encouragement of Professor G. de HALLER throughout the course of this work is gratefully acknowledged. Thanks are also due to Professor M. FISCHBERG for hospitality and facilities in the Station de Zoologie Expérimentale, and to Dr. J. DUBOCHET M. and Professor KELLENBERGER and Professor N. R. WILLIAMS for sending preprints of their manuscripts and exchanging helpful discussion, to Doctor J. FRANKEL and Doctor R. PECK for valuable criticism of this manuscript. I am indebted to Mrs M. TSCHOPP and Mr E. NAGY for technical assistance in Electron Microscopy.

REFERENCES

- ARGETSINGER J. (1965). — The isolation of ciliary basal bodies (kinetosomes) from *Tetrahymena pyriformis*. *J. Cell Biol.*, **24**, 154-157.
- CHILD F. M. & MAZIA D. (1956). — A method for the isolation of the parts of Ciliates. *Experientia*, **12**, 161-165.
- DUBOCHET J., DUCOMMUN M., ZOLLINGER M. & KELLENBERGER E. (1971). — A new preparation method for dark-field electron microscopy of biomacromolecules. *J. ultrastr. res.*, **35**, 147-167.
- FLEISCHER S., FLEISCHER B. & STOECKENIUS W. (1967). — Fine structure of lipid-depleted mitochondria. *J. Cell Biol.*, **32**, 193-208.
- FRANKE WERNER W. (1971). — Membrane-microtubule-microfilament-relationships in the ciliate pellicle. *Cytobiologie*, **4**, 307-316.
- GIBBONS I. R. (1963). — Studies on the protein components of Cilia from *Tetrahymena pyriformis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **50**, 1002-1010.
- HOFFMAN E. J. (1965). — The nucleic acids of basal bodies isolated from *Tetrahymena pyriformis*. *J. Cell Biol.*, **25**, 217-228.
- HUFNAGEL L. A. (1969). — Cortical ultrastructure of *Paramecium aurelia*. Studies on isolated pellicles. *J. Cell Biol.*, **40**, 779-801.
- KENNEDY J. R. and ZIMMERMANN A. M. (1970). — The effects of high hydrostatic pressure on the microtubules of *Tetrahymena pyriformis*. *J. Cell Biol.*, **47**, 568-576.
- PITELKA D. R. (1961). — Fine structure of the silverline and fibrillar systems of three tetrahymenid ciliates. *J. Protozool.*, **8**, 75-89.
- RANNESTAD J. R. & WILLIAMS N. E. (1971). — The synthesis of microtubule and other proteins of the oral apparatus in *Tetrahymena pyriformis*. *J. Cell Biol.*, **50**, 709-720.
- SATIR B. & ROSENBAUM J. L. (1965). — The isolation and identification of kinetosome-rich fractions from *Tetrahymena pyriformis*. *J. Protozool.*, **12**, 397-405.
- SEAMAN G. R. (1960). — Large scale isolation of kinetosomes from the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis*. *Exptl. Cell Res.*, **21**, 292-302.
- VAUDAUX P. (1971). — Action de l'EDTA sur le Cilié *Tetrahymena pyriformis*. *J. Protozool.*, **18**, suppl. 215.
- WOLFE J. (1970). — Structural analysis of basal bodies of the isolated oral apparatus of *Tetrahymena pyriformis*. *J. Cell Sci.*, **6**, 679-700.

